

紫外线对枯草芽孢杆菌生产菌株的诱变与筛选

马加强, 吴明, 马礼鹏, 刘博* (中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘要 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种革兰氏阳性菌,具有种类多、分泌蛋白能力强、安全性好等优点,是一种重要工业酶和工业制剂的菌种,被广泛应用于医药、食品、农业、饲料、造纸和纺织等多种领域。为了进一步提高枯草芽孢杆菌的发酵能力,采用紫外线照射的方法诱导筛选高产菌株。对通过紫外线诱导提高枯草芽孢杆菌产淀粉酶、蛋白酶、 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -acetolactate decarboxylase,简称 α -ALDC)、3-羟基丁酮(Acetoin)和葡萄糖-1-磷酸(Glucose-1-phosphate,简称G-1-P)能力的条件进行了比较。

关键词 枯草芽孢杆菌;紫外线诱导;酶制剂;3-羟基丁酮;葡萄糖-1-磷酸

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-018-03

Mutation and Screening of Ultraviolet Radiation on Strains Production of *Bacillus subtilis*

MA Jia-qiang, WU Ming, MA Li-peng, LIU Bo* (College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081)

Abstract *Bacillus subtilis* is a kind of gram positive bacteria, which has many advantages, such as abundant varieties, strong ability of secreting protein, good safety and so on. It is a kind of important industrial enzyme and industrial formulation, and has been widely used in many fields, such as medicine, food, agriculture, feed, paper and textile. In order to further improve the fermentation ability of *Bacillus subtilis*, the high yield strain was induced by UV irradiation. The conditions for improving the production of amylase, protease, α -ALDC, acetoin, glucose-1-phosphate were compared by ultraviolet radiation.

Key words *Bacillus subtilis*; Ultraviolet mutation; Enzyme preparation; Acetoin; Glucose-1-phosphate

枯草芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,呈直杆状,内生芽孢,好氧,其菌落不透明,呈白色或微黄色,表面粗糙,可将体内生产的蛋白分泌到胞外。枯草芽孢杆菌广泛分布于土壤、动植物表面和湖泊海洋中,正是因为其生活环境的多样化,可以利用多种环境中丰富的物质,所以细菌体内有丰富的产酶系统,具有产生多种酶的潜力,可以生产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、果胶酶、 β -葡聚糖酶、植酸酶、果胶酶、聚糖酶、纳豆激酶、维生素、寡糖、小肽、氨基酸、增味剂、葡萄糖-1-磷酸和3-羟基丁酮等,应用于食品、纺织、医药、科研、造纸、皮革、环保与饲料养殖中^[1-4]。枯草芽孢杆菌是经我国农业部认定的2种饲料添加菌种之一,也是美国食品药品监督管理局(FDA)认定的安全菌种^[5]。枯草芽孢杆菌是工业酶生产的主要菌种之一,仅有由其生产的蛋白酶、淀粉酶。其中,脂肪酶就占据整个酶市场的50%以上^[1,3]。在食品领域,枯草芽孢杆菌生产的酶占世界食品工业酶总量的60%以上,在我国食品工业酶中由枯草芽孢杆菌生产的酶占85%以上。枯草芽孢杆菌作为一种发酵菌种,在很多方面都有大量应用。

虽然枯草芽孢杆菌在生产中起到了重要作用,但其产量仍未能满足人类的需求。为了满足人类在生产生活和环保、科研等方面的应用,科研工作者通过物理和化学等方法对枯草芽孢杆菌的菌种进行诱导,从中筛选出所需产品产量高的菌种进行传代培养,稳定产量。物理诱变方法有很多,包括 α 射线、 β 射线、 γ 射线、X射线、中子和其他粒子、紫外线、微波等物理因素辐射促进遗传物质发生突变,其中紫外线诱导突变是工业为生物育种中最为普遍的一种。作为遗传物质的DNA,对紫外线有强烈的吸收作用,可以造成DNA的断裂以及碱基的破坏,但其主要作用形式是通过同一条链上的相

邻或双链之间的嘧啶形成二聚体,这是因为嘧啶与嘌呤相比对紫外线更为敏感,干扰DNA双链的分开与碱基的配对,使DNA不能正常复制与表达,从而使微生物死亡或发生突变。由于紫外线与 α 射线、 β 射线、 γ 射线、X射线和中子等其他射线和粒子相比更加普及,操作方便,并且诱导效率高,不易发生回复突变,在微生物诱变育种中广泛使用。笔者对用紫外线诱导枯草芽孢杆菌育种提高生产效率的方法和结果进行了对比分析。

1 枯草芽孢杆菌的诱变和选育

1.1 高产蛋白酶枯草芽孢杆菌菌株的诱变与选育 蛋白酶可以催化肽键水解,广泛应用于食品加工、纺织、医药、皮革和洗涤剂等领域中。NIU C H等^[5]从吉林省农业科学院食品生物技术实验室中选取10株菌株,检测蛋白酶的产量,从中选取酪素培养基平板上透明圈与菌落直径比最大(3.01)的菌落,接种到LB液体培养基中摇床培养2h后每隔2h取样检测OD值,选取生长曲线对数中前期的细菌进行诱变试验,在30cm处进行0~240s间隔20s的取样,将所有样品的菌悬液稀释后在平板上涂布,以未经紫外线处理的稀释菌悬液涂布平板作为对照,经过在37℃下培养24h后进行菌落计数。选取照射时间180s、致死率76.91%的菌落筛选后得到5株菌株,选择正突变中透明圈与菌落直径比值最大(5.52)的菌株进行传代培养,透明圈与菌落的比值分别为5.26、5.68、5.58、5.29和5.67,酶活力基本保持稳定。

1.2 高产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌菌株诱变于选育 淀粉酶是一种在日常生产过程中应用十分广泛的一种酶,发挥消化酶的作用,治疗消化类疾病,将其加入洗涤剂中可以提高洗涤剂的效用。此外,枯草杆菌产生的淀粉酶还可以分解水体中的饵料、动物排泄物和有害气体等,有助于水产养殖业的同时还能净化水质。XIE F X等^[6]从养虾池、混养池底质活性污泥和污染河流底质活性污泥中通过革兰氏染色、芽孢

作者简介 马加强(1994-),男,山东菏泽人,本科生,专业:生物技术。
*通讯作者,讲师,从事民族植物学与民族资源学研究。

收稿日期 2016-05-18

染色、鞭毛染色、淀粉酶试验、明胶液化试验等鉴定筛选出 12 株菌株,接种到淀粉培养基上筛选出产酶能力最强(透明圈与菌落直径最大)的 2 株菌株,比值分别为 2.27 和 3.11,用 3,5-二硝基水杨酸法所测的酶活分别为 38.66 和 37.10 U/mL,将这 2 株菌株接种到培养皿上距离 25 cm 用 20 W 的紫外线灯等进行 4 min 间隔照射,分别选取致死率为 91% 与 90% 的培养基上的菌株进行产酶能力的测定,将其中酶活值达到最高的 2 株进行第 2 次与第 1 次条件相同的诱变试验,最终得到 3 株产酶能力最强的菌株,其透明圈与菌落比值分别为 3.21、2.67 和 2.90,用 3,5-二硝基水杨酸法所测的酶活为 56.95、50.47 和 50.02 U/mL。

1.3 高产 α -乙酰乳酸脱羧酶枯草芽孢杆菌菌株诱变与选育 α -乙酰乳酸脱羧酶可以将乙酰乳酸(Acteolatato)直接转化为乙偶姻(Actetoin),而不必经过双乙酰(Diacetyl),因为双乙酰在啤酒发酵中出现的造成不良风味的一种物质,因此被广泛地应用于啤酒生产中。WANG Z 等^[7]选择实验室中的枯草芽孢杆菌菌株 BS059,采用波长 260 nm、功率 15 W 的紫外线在距离 30 cm 处进行照射,辐射时间分别为 10、20、35、60 和 90 s,取诱变后的菌株进行 V.P. 显色反应,结果表明在 50 s 时正突变率最大(43.3%),此时存活率为 21.15%,选取此时的菌株进行产酶发酵药瓶培养后得到 2 株酶活最高的菌株分别为 0.627 和 0.792 U/mL,与出发菌株的酶活(0.302 U/mL)相比分别提高了 107.62% 和 162.25%。

1.4 高产 3-羟基丁酮枯草芽孢杆菌菌株诱变与选育 3-羟基丁酮,别名乙偶姻、甲基乙酰甲醇,是一种被我国 GB2760-86 和美国食品与萃取协会(FEMA)允许广泛应用的食用香料,可用于奶油、干酪和咖啡等食品的添加,并自然存在于玉米、苹果和可可香蕉中。YIN M H 等^[8]选用实验室保存的 YD-1 菌种先通过发酵培养后,采用肌酸甲苯酚法测定 3-羟基丁酮的含量并采用 DNS 方法测定葡萄糖的含量。调整菌液浓度为 10^7 个/mL 在照射距离为 25 cm、紫外线功率 15 W 的条件下分别照射 10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 s,取照射后的菌种稀释 10 倍后培养并计数,绘制致死曲线,选取诱变时间为 30 s、致死率为 80% 的菌株进行发酵试验,测得产量最高的菌株 MB-2 的产量最高(18.46 g/L),残糖量为 0.38%,原菌株 YD-1 的 3-羟基丁酮的产量为 12.60 g/L,残糖量为 0.87%,连续传代 20 次,分别选取第 5、10、15、20 代进行 3-羟基丁酮含量的测定,3-羟基丁酮含量分别为 18.32、18.72、18.10 和 18.62 g/L,产量保持相对稳定。采用 RAPD 法检测了 DNA 条带,发现在 3 000 和 3 800 bp 处出现了 2 条不同于原菌种的条带。

1.5 高产葡萄糖-1-磷酸枯草芽孢杆菌菌株的诱变与选育 葡萄糖-1-磷酸使动物糖酵解中的重要产物,可以作为反应起始物合成二磷酸葡萄糖苷、麦芽寡糖和海藻糖,此外它还是制备细胞增殖抑制、抗生素和抗癌剂的原料药。为了提高葡萄糖-1-磷酸的产量,实现其工业化生产应用的目的,许向华从土壤中筛选到 1 株葡萄糖-1-磷酸的枯草芽孢杆菌菌株,命名为 *Bacillus subtilis* XH-13,测定生长曲

线,选取培养 12 h 的菌悬液稀释后涂布在平板上放在 20 W 的紫外灯下 30 cm 处,分别照射 3、6、9、12、15 和 18 s,照射 12 s 后致死率达到 79.17%,采用高相液相色谱-质谱法进行(HPLC-MS)检测,出发菌株的葡萄糖-1-磷酸的产量为 4.45 g/L,诱变菌株中的最高产量为 5.58 g/L,此后进行第 2 轮和第 3 轮诱变,所得的菌株的最高产量分别为 6.63 和 6.85 g/L,对第 3 轮诱变后最高产量的菌株进行 6 代传代培养,所得到的每代菌株的葡萄糖-1-磷酸的产量的平均值为 6.843~6.863,菌株产量十分稳定。

1.6 高产植酸酶枯草芽孢杆菌菌株的诱变与选育 植酸酶可以改善饲料的质量,提高禽畜对饲料的利用率,改善家畜肉质,减少家畜对磷元素的排泄,从而降低对环境的污染。BAO Z G^[4]用紫外线、亚硝基胍(NTG)和紫外线-亚硝基胍复合法对枯草芽孢杆菌进行诱变育种,其中以紫外线的酶活提高效率最高。选用中国微生物菌种保藏中心的枯草芽孢杆菌 B10333,涂布于培养皿上置于距 20 W 紫外灯距离 30 cm 处分别照射 0、20、40、60、80 和 100 s。选取照射 100 s、致死率为 77.2% 的菌株进行筛选,采用 GBT 法测定酶活,出发菌株的酶活为 51.97 U/mL,诱变后的菌株产酶酶活为 71.96 U/mL。对诱变菌株进行 5 代传代培养,并分别进行 WEB 液体培养基摇床发酵培养,植酸酶活性的平均值为 71.78~72.07 U/mL,遗传较为稳定。

2 枯草芽孢杆菌紫外诱变的对比分析

枯草芽孢杆菌作为一种常用的发酵菌种,可以用来生产多种酶和化学产品,但为了提高产品的产量所用的诱导条件各不相同,结果也有所差异。在使用紫外线进行枯草芽孢杆菌诱导时,紫外线强度大多为 15~20 W,辐射距离为 25~30 cm,但各自所用辐射时间差异较大,最终经过紫外线的辐射后枯草芽孢杆菌所产的产物产量大多提升 50% 左右,经过传代培养,传代后的枯草芽孢杆菌产物产量较为稳定,与诱变后的第 1 代产量相比稳定在 90% 左右,甚至高达 99%~101%,基本不变(表 1)。

3 讨论

枯草芽孢杆菌作为一种工业上的主要发酵菌种之一,可以存活于多种环境中,同时产生多种酶类,包括 α -淀粉酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶、植酸酶、木聚糖酶和纳豆激酶等,被广泛应用于医药、纺织、食品、农业、畜牧、科研和环境防治等领域。纳豆激酶(丝氨酸蛋白激酶)具有溶栓作用,可以用于心血管疾病的防治;淀粉酶和纤维素酶可以发挥体内消化物质的作用,用作胃肠消化疾病的药物;蛋白酶可用于分解伤口发炎部位的纤维蛋白的凝结物,有助于伤口附近腐肉、黏块和碎屑的清理,可用于损伤药处理伤口时的伤口清洗。枯草芽孢杆菌可直接将所表达的蛋白分泌到体外,简化了生产工艺,但其分泌的降解蛋白酶也会对产物造成影响,也缺乏专用的表达载体。利用枯草芽孢杆菌制成的活菌制剂杀菌剂在防治白粉病、霜霉病、灰霉病、水稻瘟病和小麦纹枯病等多种农作物的疾病上都有显著作用,已在多个国家中注册并应用于商业中。在饲料中添加枯草

芽孢杆菌有助于饲料中氮和磷的吸收,同时造成厌氧环境有助于肠胃中厌氧微生物的生长促进肠胃中的消化,在水产养殖中还可分解水中污染物,在净化水质的同时可以提高水中的营养含量。此外,枯草芽孢杆菌生产的酶还可用于加入洗涤剂清洗衣物、造纸中的脱墨、羊毛和彩棉纺织品的处理以

及皮革生产中。由于酶的广泛应用使得2004年酶制剂的全球交易额已达到20亿美元,而枯草芽孢杆菌所生产的酶在市场中占50%以上,但是由于科研水品的限制,我国的酶制剂工业远远未达到世界先进水平,提高枯草芽孢杆菌酶制剂的产量也是其中的重要工作之一。

表1 枯草芽孢杆菌紫外诱变育种条件和结果的比较

Table 1 Comparison of conditions and results of ultraviolet mutation breeding of *Bacillus subtilis*

发酵产物 Fermentation products	菌株来源 Strain source	紫外线强度 UV intensity W	照射时长 Duration of irradiation//s	辐射距离 Radiation distance//cm	诱变致死率 Induced death rate//%
蛋白酶 Protease	吉林省农业科学院食品生物技术实验室		180	30	76.91
胞外淀粉酶 Extracellular amylase	混养池、养虾池底质活性污泥和污染河流底质活性污泥分离菌株	20	240,240	25	91.90
α -乙酰乳酸脱羧酶 α -acetolactate decarboxylase	安徽工程科技学院生物化学工程系实验室菌种 BSO59	15	50	30	78.85
3-羟基丁酮 Acetoin	青岛大学生物系实验室菌种 YD-1	15	30	25	80
葡萄糖-1-磷酸 Glucose-1-phosphate	吉林农业大学食品科学与工程学院筛选菌种 XH-13	20	12	30	79.17
植酸酶 Phytase	中国工业微生物保藏中心	20	100	30	77.20

发酵产物 Fermentation products	诱变轮数 Number of mutation	生长曲线筛选 的时间 Growth curve screening time//h	平均酶活 变化率 Average enzyme activity variation//%	传代数 Passage number	传代产物产 量的变化率 Yield change rate of passage product//%
蛋白酶 Protease	1	8	166.78	5	95.29 ~ 102.90
胞外淀粉酶 Extracellular amylase	2		141.68	3	89.25 ~ 101.37
α -乙酰乳酸脱羧酶 α -acetolactate decarboxylase	1		134.94	3	92.80 ~ 107.97
3-羟基丁酮 Acetoin	3	6	146.51	20	98.05 ~ 101.41
葡萄糖-1-磷酸 Glucose-1-phosphate	3	12	153.93	6	99.90 ~ 100.19
植酸酶 Phytase	1		138.46	5	99.75 ~ 100.15

通过对多个枯草芽孢杆菌紫外线诱变育种的比较,笔者发现虽然所用的紫外线照射的条件相似,但照射的时间却有所不同。尽管如此,最终所得的结果与原菌种相比产量大都提升了50%,但很难再有大幅度提升。BAO Z G^[4]在研究植酸酶的发酵时曾用紫外线诱变使酶活提高了38.46%,以NTG诱导使酶活提升了35.04%,用UV-NTG与NTG-UV复合诱导提高36.98%和26.28%,说明紫外线诱导所造成的正突变效果相对显著。大量研究表明当致死率达到70%~80%时,正突变频率较高,王洲所绘制的变异曲线表明当照射时间为50s时正突变率最大达到43.33%,同时变异率也达到最大(73.3%),此时的致死率为78.85%^[5,7,9]。上述研究大都选择致死率为70%~80%,接近80%,但到达致死率所用的时间不同,较短时只需十几秒,较长时要用几十秒甚至几分钟,其主要原因是因为有些研究先将配制的菌悬液置于紫外灯下进行诱变,然后进行稀释菌液涂布平板,因为要对所有细菌进行充分照射,所用的时间较长。NIU C H等^[5]诱导高产蛋白酶菌株;XIE F X等^[6]诱导高产淀粉酶菌株;WANG Z等^[7]诱导高产 α -ALDC等;而有些研究先进行平板的涂布,再直接进行紫外线诱变,所用时间较短。XU X H等^[9]对葡萄糖-1-磷酸高产菌种的选育。此外,菌液的浓度也会造成一定的影响。虽然紫外线照射强度和距离和培养基种类等也会对达到合适致死率时间有所影响,但最主要的因素还是两种因素。虽然大多数诱变方式是进行菌液的

照射,但笔者认为后一种照射方式能够更加均匀地照射到所有菌株,适合诱变选育。进行诱变和涂布时要选择合适的菌液浓度,防止浓度过大或过小使得计数不便,照射时大多会选用浓度为 10^7 个/mL或 10^8 个/mL的菌液^[7-8],进行涂布时选用100个/mL或1000个/mL的菌液浓度,方便计数。生物体内有通过光修复或暗修复应对损伤的DNA损伤修复机制,因此在进行紫外线诱变后要在红光下进行防止枯草芽孢杆菌进行回复突变。对于已经选择的菌株在进行诱变前最好再进行一次生长时期的筛选,选择进入生长期的菌株,在此时期不仅菌群的生活状态较为一致,代谢效率较高,而且由于处于快速繁殖时期,DNA复制较为频繁,突变率高。由于所使用的培养基和初始培养时的菌液浓度不尽相同,所以对数生长期也不同,因此在研究时要选择合适的培养基和初始菌液浓度,减少培养基用量,将初始菌液浓度控制在一定范围,将菌落的对数生长期控制在6~8h,节省研究时间和材料用量。在进行紫外线诱变后,菌种内的遗传物质会发生改变,会导致菌种死亡或发生正突变或负突变。YIN M H等^[8]和WANG Z等^[7]的研究表明经过诱变的菌株的会与原菌株的DNA条带有所差异,可能会多出条带,也可能相同位置的条带更亮,说明经诱变后菌株DNA确实发生了变异可能是基因结构的改变,也可能是相同片段的重复增加。此外,WANG Z等^[7]的突变曲线表明正突变在随着照射时间的

(下转第72页)

表2 甲维盐在烟叶和土壤中的消解动态

Table 2 Degradation dynamics of emamectin benzoate in tobacco leaves and soil

样品 Sample	试验地点 Test site	消解方程 Degradation equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	半衰期 Half life//d
烟叶 Tobacco leaf	山东	$y = 0.0293e^{-0.1282x}$	0.8443	5.4
	四川	$y = 0.0122e^{-0.1578x}$	0.9315	4.4
土壤 Soil	山东	$y = 0.0038e^{-0.4356x}$	0.9536	1.6
	四川	$y = 0.0015e^{-0.265x}$	0.9547	2.6

g a. i./hm² 分别施药 2、3 次,施药间隔期 7 d,于最后一次施药后 7、14、21 d 采集烟叶样品,并按照三段式烘烤工艺烘烤。山东、四川 2 年烟叶和土壤最终样品中甲维盐残留量均小于方法 LOQ(烟叶 0.008 mg/kg,土壤 0.000 5 mg/kg)。

3 结论

采用分散固相萃取净化、柱前衍生、高效液相色谱-荧光法测定甲维盐在烟叶及土壤中的残留量,结果表明,该方法操作简便,有机溶剂用量少,符合农药残留检测技术对灵敏度、准确度及精密度的要求。

该试验对甲维盐在烟叶和土壤中的残留消解动态及最终残留量进行了研究,结果表明,甲维盐在烟叶和土壤中降解速率较快,半衰期分别为 4.4~5.4 和 1.6~2.6 d。按照 2.250 和 3.375 g a. i./hm² 于烟草旺长中后期喷雾施药 2~3 次,安全间隔期 7 d 时,烤后烟叶样品中甲维盐残留量均低于 0.008 mg/kg。国际烟草合作研究中心(CORESTA)尚未规定甲维盐在烟草上的指导性残留限量。GB 2763—2014 规定阿维菌素在干辣椒中的最大残留限量(MRL)为 0.2 mg/kg^[15]。由于干辣椒和烟草的膳食结构比例相似,以阿维菌素在干辣椒中的 MRL(0.2 mg/kg)为参考进行风险评估,甲维盐在烟草上的使用剂量和方法用于烟草烟青虫的防治,其残留量是安全的。

参考文献

- [1] 王圣印,周仙红,张安盛,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐研究进展[J]. 江西农业学报,2012,24(12):123-126.
- [2] 李增梅,赵善仓,梁京芸,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻

- 田中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的残留量[J]. 分析测试学报,2014,33(1):78-82.
- [3] 王小丽,王素利,陈振山,等. 黄瓜及其栽培土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的残留动态研究[J]. 农业环境科学学报,2008(21):307-310.
- [4] 曹爱华,孙惠青,徐金丽,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在烟草及土壤中残留分析方法的研究[J]. 中国烟草科学,2010,31(4):64-68.
- [5] SINGH G, CHANHIL G S, JYOT G, et al. Degradation dynamics of emamectin benzoate on cabbage under subtropical conditions of Punjab, India [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2013, 91(1): 129-133.
- [6] 孙明娜,万宇,朱传明,等. 液相色谱-荧光法测定甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在甘蓝和土壤中的残留[J]. 安徽农业科学,2008,36(18):7533-7534.
- [7] 李瑞娟,于建奎,宋国春,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐微乳剂在甘蓝和土壤中的残留研究及安全使用[J]. 中国农学通报,2011,27(21):266-271.
- [8] 张侃侃,胡德禹,张钰萍,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在水稻环境中的残留及消解动态[J]. 农药学报,2010,12(2):190-194.
- [9] 程永,苗建强,杨凯凯,等. 加工剂型对土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐检测方法及其降解动态的影响[J]. 农业环境科学学报,2011,30(12):2526-2532.
- [10] 于沛博,侯志广,马晓亮,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在大白菜及土壤上的残留动态研究[J]. 吉林农业(学术版),2011(4):88-90.
- [11] 罗成玉,查玉兵,任俊华,等. 高效液相色谱荧光检测法测定植物性食品中阿维菌素类药物[J]. 分析仪器,2012(3):31-35.
- [12] 李洪奎,陈子雷,孙平,等. 甲氨基阿维菌素在非菜上残留研究[J]. 农药科学与管理,2013(7):30-32.
- [13] XIE X, YAO F, WU Y, et al. Simultaneous analysis of three avermectins in soils by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. International journal of environmental analytical chemistry, 2012, 92(12):1417-1428.
- [14] 中华人民共和国农业部农药检定所. 农药登记残留田间试验标准操作规程[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2014[S]. 北京:中国农业出版社,2014.

(上接第 20 页)

增加会有有一个最大值,但负突变可能会在 1 个峰值出现后继续增大。

4 结论

在设计对枯草芽孢杆菌进行紫外线诱变提高产品产量的试验时,常在 20~30 cm 处以 15~20 W 的功率进行间隔照射,对菌液照射到的话间隔时长大多为 10~20 s,有时也可用梯度间隔,设置 6~10 个间隔,选取致死率为 70%~80% 的存活菌种进行培养,最终产物的产量大约会提升 50% 左右,且后代基本保持稳定不变。

参考文献

- [1] HUI M, DOU L N, TIAN Q, et al. Advances in application research of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(27):11623-11624, 11627.
- [2] MING L, BAO S. Progress and application of *Bacillus subtilis* in different fields [J]. Journal of northeast agricultural university, 2009, 40(9):

- 111-114.
- [3] 马明,杜金华. 枯草芽孢杆菌酶在工业生产中的应用[J]. 山东科学, 2006,19(3):35-38.
- [4] BAO Z G. Study on breeding of phytase-producing *Bacillus subtilis* and its fermentation products from cottonseed meal source [D]. Shihezi: Shihezi University, 2013:1.
- [5] NIU C H, GAO Y, LI Y Q, et al. Selections of high protease-producing strain of *Bacillus subtilis* by UV mutation [J]. China brewing, 2011, 12: 67-69.
- [6] XIE F X, ZHAO Y J, ZHOU K, et al. The isolation, screening and ultraviolet mutation breeding of *Bacillus subtilis* strains producing extracellular amylase [J]. ATCA agriculture boreali-sinica, 2009, 24(3):78-82.
- [7] WANG Z, YANG C Y. The mutation effect of UV irradiation on a strain *Bacillus subtilis* producing α -acetolactate decarboxylase [J]. Chinese agricultural science bulletin, 2007, 23(4):95-97.
- [8] YIN M H, XU H, CHENG D L, et al. Selection of high acetoin-producing strain of *Bacillus subtilis* by UV mutation [J]. China brewing, 2010(4):76-77.
- [9] XU X H, SHI J H, ZHAO G G, et al. UV mutation of *Bacillus subtilis* for breeding of glucose-1-phosphate high-producing strain [J]. China dairy industry, 2011, 39(9):21-23.