

鱼塘底泥中紫色非硫细菌的分离及鉴定

樊淑华, 王永立

(周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466001)

摘要: 为了解鱼塘污泥中光合细菌的类群分布, 利用特异性培养基对采自周口地区鱼塘的泥水样品进行富集、分离和纯化, 得到 4 株紫色非硫细菌(PNSB)。根据菌落及菌体形态学观察、活细胞吸收光谱测定、碳源和生长因子利用等生理生化试验, 确定 PSB-1 和 PSB-4 菌株属于红假单胞菌属中的沼泽红假单胞菌, PSB-2 菌株属于红假单胞菌属中的荚膜红假单胞菌, PSB-3 菌株属于红细菌属中的万尼氏红微菌。研究表明, 鱼塘污泥中广泛存在紫色非硫细菌类群。

关键词: 紫色非硫细菌; 富集培养; 分离; 培养

中图分类号: S963.21⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)04-0154-03

Isolation and Identification of Purple Non-sulfer Bacteria from the Sediments of the Rearing Pond

FAN Shu-hua, WANG Yong-li

(Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: In order to get the message of the amount distributions of photo synthetic bacteria of a fishpond in Zhoukou, four purple non-sulfer bacterial strains were isolated by enrichment and purification from the sediments of the rearing pond utilizing a specific nutrient medium. The colonial morphology, culture characteristic, absorb spectrum of living cells, various organic carbon sources and the biochemical characteristics were investigated. The results showed that strains of PSB-1 and PSB-4 belong to *Rhodopseudomonas palustris*, strain PSB-2 belongs to *Rhodopseudomonas capsulatus* and strain PSB-3 belongs to *Rhodomicrobium vannielii*. This indicates that there are prevalent genus and species of purple non-sulfur bacteria in the mud of rearing pond.

Key words: purple non-sulfur bacteria; enrichment culture; isolation; identification

光合细菌(photo synthetic bacteria, PSB)是自然界中能利用光合作用产能的细菌, 根据伯杰氏细菌分类手册记载, 能够得到纯培养物的不产氧光合细菌有 21 个属, 58 个种^[1]。紫色非硫细菌(purple nonsulfur bacteria)是光合细菌(PSB)中最重要的一大类, 是无氧光合细菌中种属最多、分布最广、形态生理生化特征最为多样、系统发育最为复杂的一群^[2]。它们不仅具有独特的固碳、固氮、脱氢、氧化等生理功能, 而且其菌体蛋白质含量高达 65% 以上, 各种维生素、辅酶等生物活性物质含量非常丰富, 被广泛用作鱼虾的饲

料及饵料添加剂^[3]。在周口地区, 紫色非硫细菌制剂在水产养殖业中应用非常广泛, 主要用于养殖池内水质净化和水产动物饲料添加。但该地区使用的光合细菌制剂多为直接购买的商品菌种, 极少有从当地分离的紫色非硫细菌用于水产养殖的。不同生态型的光合细菌能够适应不同的环境条件, 不同地点分离得到的光合细菌净化水体的能力也存在一定的差异^[2]。为此, 从周口市某鱼塘分离并鉴定了池塘底泥中的光合细菌, 旨在为周口地区水产养殖业非商品化光合细菌制剂中应用提供科学的参考依据。

收稿日期: 2011-12-08

基金项目: 周口师范学院青年科研基金资助项目(zknuqn200906)

作者简介: 樊淑华(1980-), 女, 河南睢县人, 讲师, 硕士, 主要从事微生物学研究。E-mail: fanshuhuayan@126.com

1 材料和方法

1.1 底泥样品

池塘底泥样品取自周口市川汇区沙河岸边家鱼养殖池。

1.2 培养基

富集培养基:乙酸钠 3.0 g, NaCl 1.0 g, NH_4Cl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCl_2 0.05 g, 酵母膏 0.05 g, K_2HPO_4 0.5 g, KH_2PO_4 0.6 g, 蒸馏水 1 000 mL。

纯化培养基:将富集培养基中的乙酸钠 3.0 g 换成碳酸氢钠 3.0 g, 其中固体培养基需加琼脂粉 15~20 g/L。

碳源测定培养基:富集培养基去掉碳源及酵母膏后,加入硫胺素 0.5 g、对氨基苯甲酸 0.5 g、生物素 0.01 g、烟酸 1.0 g。

1.3 光合细菌的富集、分离和纯化

用无菌铲取沙河岸边家鱼养殖池底泥,分装于 10 支中号试管中,每只试管装 1 g,向试管中加入 25 mL 富集培养基,充分振荡摇匀,并覆盖灭菌液体石蜡,置于光照培养箱中培养至培养液变成红色时,用灭菌移液管吸取培养液 1 mL,再次富集培养,使欲分离的光合细菌成为优势菌种。

取富集红色光合细菌液于分离培养基平板上,利用划线法、稀释倒平板法进行反复分离纯化,挑取不同特征的单菌落在平板上重复划线分离,直至得到纯的单个菌落。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 分离菌株的形态学观察 将分离纯化的菌株置于光照厌氧、黑暗好氧条件下培养 5~7 d,观测菌落特征。分别对菌体进行革兰氏染色、鞭毛染色、荚膜染色,并使用普通光学显微镜观察菌落形态,测量菌体大小^[4]。

1.4.2 活细胞吸收光谱测定 取菌种液体培养物

5 mL,经 4 000 r/min 离心 5 min,用生理盐水洗涤 2 次,重新悬浮于 60% 的蔗糖溶液中,定容至 10 mL,用 60% 的蔗糖溶液作为空白对照,用 Lambda25 紫外/可见分光光度计在波长 300~1 000 nm 范围测定细菌的吸光值,绘制吸光度曲线。

1.4.3 碳源及生长因子的利用试验 将碳源测定培养基中的碳源分别换成以下 10 种:碳酸氢钠、葡萄糖、乙醇、甘露醇、甘油、柠檬酸钠、谷氨酸钠、苯甲酸钠、硫代硫酸钠、酵母膏。其中硫代硫酸钠质量浓度为 0.5 g/L,其他碳源质量浓度为 2 g/L。将菌液以 3% 的比例接种至小试管中,分别加入不同碳源的液体培养基,拧上螺口帽,在温度 30 ℃、光照强度 3 000~5 000 lx 的光照培养箱中培养,做 3 个平行。

1.4.4 菌体 DNA 的提取和 G+C 含量测定 采用苯酚-氯仿混合法提取细菌染色体 DNA,凝胶电泳分离纯化并测定 DNA 纯度, DNA 含量测定采用紫外分光光度法。使用 T_m 法测定细菌的 G+C 含量,从 DNA 热变性曲线上求得 T_m 值,使用公式 $G+C(\%) = (T_m - 69.3) \times 2.44$ 计算菌体 DNA 的 G+C(%) 含量^[5-6]。

2 结果与分析

2.1 光合细菌的分离纯化及形态学观察

样品经液体培养基富集培养 7 d 后,培养基呈棕红色,随时间延长,培养液颜色逐渐加深,并表现出贴壁生长的倾向;第 2 次富集时,菌体生长较快,4 d 左右培养液颜色变为深红色。观察结果表明,光合细菌已成为优势菌种。

在琼脂分离培养平板上分离到 4 株光合细菌,保存并命名为 PSB-1、PSB-2、PSB-3、PSB-4。4 菌株分别形成紫红色、黄色、棕红色、橙红色的絮状、点状菌落,直径 1~5 mm。其中 PSB-2、PSB-3 菌株表面粗糙,PSB-1、PSB-4 表面光滑湿润、质地柔软、边缘整齐,4 株菌落形态学特征详见表 1。

表 1 分离的 4 株细菌菌落形态学特征

项目	PSB-1	PSB-2	PSB-3	PSB-4
光照厌氧菌颜色	紫红	黄色	暗红	橙红
黑暗好氧菌颜色	无色	粉红至红	浅黄	浅黄
菌落大小/mm	1~2	4~5	2~3	1~2
菌体大小/ μm	$(0.5 \sim 0.8) \times (1.2 \sim 2.0)$	$(0.8 \sim 1.0) \times (2.0 \sim 2.5)$	$(1.0 \sim 1.2) \times (2.0 \sim 3.0)$	$(0.5 \sim 0.8) \times (1.2 \sim 2.0)$
菌体形态	短杆状	球形,成链状	卵球形	短杆状
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻
鞭毛染色	极生	极生	周生	极生
荚膜染色	—	—	+	—
分裂方式	芽生	二分分裂	二分分裂	芽生

注: + 为阳性反应; — 为阴性反应。

2.2 活细胞吸收光谱测定结果

4 株光合细菌活细胞分别经紫外线可见光光度计连续扫描,得到菌株活细胞吸收光谱,4 菌株在波长 375 nm、440~450 nm、470~480 nm、500~510 nm、590 nm、800~810 nm、830~890 nm 出现最大吸收峰,表明 4 菌株均含有细菌叶绿素 a 和类胡萝卜素。PSB-1 菌株的吸收峰值分别存在于 375 nm、480 nm、525 nm、590 nm、845 nm、890 nm 处,其中 375 nm、590 nm、845 nm、890 nm 为细菌叶绿素 a 的特征吸收峰,480 nm、525 nm 为类胡萝卜素的特征吸收峰,如图 1 所示。

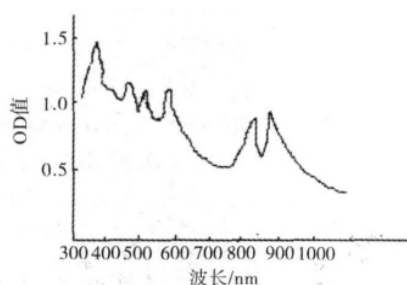


图 1 PSB-1 菌株活细胞吸收光谱

2.3 分离菌株在不同碳源中的生长情况

菌株在碳酸氢钠、乙酸钠、葡萄糖、乙醇、甘露醇、甘油、柠檬酸钠、谷氨酸钠、苯甲酸钠、硫代硫酸钠、酵母膏为碳源的培养基中培养,生长情况见表 2。由表 2 可知,所有分离菌株都能利用碳酸氢钠作为唯一碳源和电子供体,乙酸钠、谷氨酸钠是各菌株适宜的碳源;4 菌株都不能利用甘露醇和柠檬酸钠。由于杂菌对无机碳源的利用能力较差,所以在菌种传代和纯化时,为了减少杂菌的污染,可以将碳酸氢钠作为唯一的碳源来培养。

表 2 分离菌株碳源利用试验结果

菌号	PSB-1	PSB-2	PSB-3	PSB-4
碳酸氢钠	+	+	+	+
乙酸钠	+	+	+	+
葡萄糖	-	+	-	-
乙醇	+	-	+	+
甘露醇	-	-	-	-
甘油	+	-	-	+
柠檬酸钠	-	-	-	-
谷氨酸钠	+	+	+	+
苯甲酸钠	+	-	-	+
硫代硫酸钠	+(+)	-	-	+(+)
酵母膏	++	+(+)	+(+)	++

注:++为生长较好;+为生长;-为不生长;+(+)为长时间培养生长。

2.4 菌株的 G+C 含量

根据 Tm 法,计算出 PSB-1、PSB-2、PSB-3、PSB-4 细菌 DNA 的 G+C 含量分别为 65.2%、66.3%、62.9%、66.2%。

3 结论与讨论

以《伯杰氏细菌鉴定手册》为依据,根据菌株的形态结构、生理生化特征,此次分离出的 PSB-1 和 PSB-4 菌株属于红假单胞菌属沼泽红假单胞菌,PSB-2 菌株属于红假单胞菌属荚膜性红假单胞菌,而 PSB-3 菌株属于红微菌属万尼氏红微菌。

在菌株的分离培养过程中发现,4 菌株均能在光照厌氧及黑暗好氧条件下生长,且具有较强的适应能力,这与光合细菌的多元化代谢能力是分不开的。而好氧和厌氧条件下光合菌的菌落颜色差别很大,其中好氧环境中培养的菌落颜色较浅,其原因可能是由于含氧量影响了细菌色素的合成;另外,试管液体培养相对于培养皿固体培养菌落颜色也有很大差别,究其原因,可能是液体培养营造了较好的厌氧环境,而平皿分离环境中氧含量较高而导致菌落颜色发生变化。

酵母膏对 PSB-1 和 PSB-4 的生长有显著的促进作用,增加其用量则菌落生长速度加快。因此,在扩大培养时,应将培养基中酵母膏的含量增加至 3 g/L 为宜。本研究中,尽管 PSB-1 和 PSB-4 同为沼泽红假单胞菌,但菌落颜色有很大差别,G+C 含量也有差异,这说明同一种菌在不同生态环境中可能会出现不同的生态型,这也印证了不同地点分离的光合细菌净化水体的能力存在一定差异的报道^[2]。

本研究从周口本地鱼塘底泥中分离出了 4 株生长良好的光合细菌,并对其生理生化特性进行了初步研究,为周口地区水产养殖业就地取材、开发适于当地水土环境的光合细菌制剂奠定了基础。

参考文献:

- [1] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984:16-64.
- [2] 姜华,李爽,张德民,等. 对虾池中紫色非硫细菌的分离及初步鉴定[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2007,30(2):220-222.
- [3] 崔战利. 沼泽红假单胞菌 X1 菌株的分离鉴定与培养基优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2004,16(3):11-14.
- [4] 周德庆. 微生物学试验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:14-30.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:39-42.
- [6] 李琳,李耀年,余为一. 细菌染色体 DNA G+C mol% 含量测定方法研究进展[J]. 动物医学进展,2003,24(1):50-52.