

一种快速筛选产聚羟基烷酸细菌方法的建立

孙燕飞^{1,2,*}, 王 翀⁴, 程模香^{1,2}, 雷勇辉^{2,3}, 熊 杰^{1,2}

(1. 新疆石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003; 3. 新疆石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832003; 4. 新疆出入境检验检疫局, 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要: 为了从土壤微生物中快速分离纯化得到产聚 β -羟基脂肪酸(PHAs)的微生物菌株, 研究比较了几种聚羟基烷酸产生菌筛选方法。结果表明, 尼罗蓝染色法优于苏丹黑染色法, 而且0.1%的尼罗蓝丙酮染液55℃染色细菌菌落10 min, 紫外灯下观察菌落, 能合成聚羟基烷酸的菌落具有明显的荧光现象。进而推出对于产生生物降解塑料菌株的染色, 尼罗蓝染色法优于苏丹黑染色法, 尼罗蓝菌落染色法是一种简单、快速、可靠的筛选聚羟基烷酸产生菌的方法。

关键词: 菌种筛选; 聚羟基烷酸; 尼罗蓝; 苏丹黑

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)04-0087-04

A Novel System for Selection of Polyester Biosynthetic Bacteria

SUN Yan-fei^{1,2,*}, WANG Chong⁴, CHENG Mo-xiang^{1,2}, LEI Yong-hui^{2,3}, XIONG Jie^{1,2}

(1. College of Life & Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Bingtuan, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 3. Department of Agronomy Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 4. Xinjiang Exit-entry Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063, China)

Abstract: In order to establish a simple, efficient and reliable method for selecting bacterium strains synthesizing polyhydroxyalkanoic acids (PHAs), several screening methods were compared. The results showed that the method of Nile blue dyeing was better than Sudan black dyeing. When colonies were dyed by Nile blue dissolved in acetone at 0.1% at 55℃ for 10min, and then visualized under UV (365nm), the positive colonies gave fluorescence. Therefore, Nile blue staining method was a better way compared to other screening methods.

Key words: Bacteria screening; Polyhydroxybutyrate(PHAs); Nile blue; Sudan black

目前, 化学合成塑料广泛渗透各行各业和人们的生活中, 成为现代社会不可缺少的重要高分子材料, 但其不可降解性, 对环境造成严重的“白色污染”, 已成为世界性公害^[1]。不可降解塑料地膜在新疆棉田大规模使用, 残留地膜严重破坏了棉田的土壤结构, 导致土壤板结, 严重阻碍了棉花的可持续生产。聚 β -羟基脂肪酸(Polyhydroxyalkanoic acids, PHAs)是一种微生物产生的生物降解塑料原料, 存在于细胞质中, 由一层膜包裹, 为0.2~0.5 μ m的颗粒, 可在自然条件下逐步降解, 直至最终分解为二氧化碳和水, 从而可以从根本上解决塑料废弃物对环境

的污染问题, 具有重要的研究开发价值。因此, 识别和分离 PHAs 阳性细菌的方法成为环境科学领域研究的热点。如何快速、准确的筛选产 PHAs 微生物显得尤为重要。目前报道的筛选方法有苏丹黑染色法和尼罗蓝染色法, 为此, 就这 2 种染料的不同染色方法进行比较分析, 期望获得最佳的筛选产 PHAs 微生物的方法。

1 材料和方法

1.1 菌种仪器和培养基

微型台式离心机; 培养箱; 荧光显微镜; 紫外光透

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 石河子大学科学技术研究发展计划项目、高层次人才科研启动资金专项(RCZX200529)

作者简介: 孙燕飞(1976-), 女, 新疆哈密人, 讲师, 在读博士, 主要从事微生物方面的教学和研究工作。*为通讯作者。

E-mail: syfei@nw.suaf.edu.cn

射仪;苏丹黑染料(sigma);尼罗蓝染料(sigma)。牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):牛肉膏 5g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,pH 7.0~7.2;贫氮培养基(g/L):葡萄糖 5g,牛肉膏 5g,蛋白胨 5g,NaCl 5g,pH 7.0~7.2^[3];筛选培养基:贫氮培养基+尼罗蓝染液^[3]。供试菌株为石河子大学生命学院实验室从土壤中分离纯化的纯培养细菌菌株 100 株,以及从微生物所菌物中心购买的产 PHAs 的真养产碱杆菌作为阳性对照。

1.2 苏丹黑染色筛选方法

苏丹黑染色液配置及染色方法参照张咏的方法^[4]。若细胞内有蓝黑色颗粒,即为产 PHAs 菌株,将筛选标准定为:显微镜视野中 60% 以上的细胞内含有蓝黑色颗粒的菌株入选。

1.3 尼罗蓝染色细菌菌落紫外透射筛选方法

将供试的 100 株细菌菌株用下列 2 种方法筛选产 PHAs 的菌株。方法一:准备好细菌筛选培养基,培养基中尼罗蓝的终质量浓度为 50 mg/L,培养板在室温下暗室里,孵育 45 min,直至胶体凝结,接种待测细菌,30℃ 的培养箱培养,孵育 36~96 h,放在紫外光透射仪上观察和照相;方法二:将菌体接种在贫氮培养基上待菌体生长 36~96 h 后用 1% 尼罗蓝丙酮溶液染色 10 min,待丙酮彻底蒸发后用紫外透射仪下检测。显示亮桔红色、粉红色或红色的细菌为 PHAs 阳性细菌^[5]。

1.4 尼罗蓝染色细菌菌体荧光显微镜筛选方法

收集 1 mL 细菌菌液,13 000 r/min 离心 30 min,小心抽去上清,加入 1 mL 1% 尼罗蓝乙醇溶液到离心管,使其充分混匀,在 37℃ 培养箱孵育 10 min,避免光照,移出 10 mL 离心管中的混匀物到载玻片上,放上盖玻片镜检。或待测菌固定→1% 尼罗蓝乙醇溶液的染缸中 55℃,染色 10 min,水冲洗,8% 乙酸溶液染色 1 min,水洗干燥,加盖玻片镜检。荧光显微镜(油镜)下 460 nm 波长处观察,显示强烈橘红色荧光细菌的为 PHAs 阳性细菌。

1.5 阳性菌株的生理指标检测

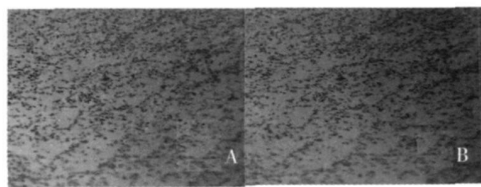
对产 PHAs 的阳性菌株进行了生理特性(革兰氏阴阳性、鞭毛、芽孢、荚膜、大小、最适温度和最适 pH)的测定,测定方法见微生物实验方法^[6]。

2 结果与分析

2.1 苏丹黑染色结果

图 1A 是供试菌株被苏丹黑染色后在放大 4000 倍的油镜下的观察结果。供试菌株均被染色成黑色颗粒状。图 1B 是苏丹黑染液涂片制片的镜检结果,显微镜下可以见到均匀的黑色颗粒,其形态

和图 1A 的菌体形状相似,故苏丹黑染色法无法很好区分菌体和染料,可见苏丹黑染料不能很好的筛选产 PHAs 菌株。

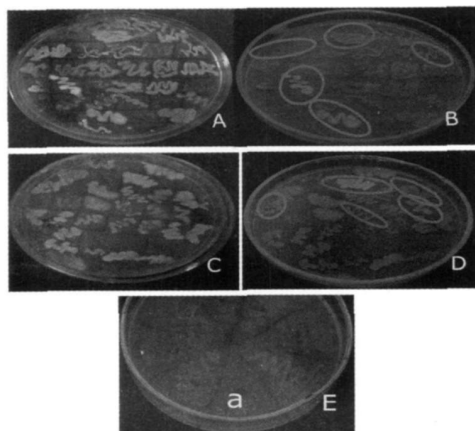


A. 菌体苏丹黑染色结果;B. 苏丹黑染料涂片镜检结果

图 1 苏丹黑染色法镜检结果(4000×)

2.2 尼罗蓝菌落染色结果

图 2A、2B、2E 是用方法一筛选的结果。图 2A 是供试细菌菌落在筛选培养基中培养 36 h 自然光下的状态,图 2B 是 2A 中供试细菌菌落培养物经紫外透射之后的图像,其中有 5 株细菌菌落显示粉红色亦或红色,此 5 株菌落为 PHAs 产生阳性菌落。但尼罗蓝染色液加入培养基也会影响某些菌体生长,如图 2E 中的 a 菌株,其长势受到染料限制(对照正常),几天后就死亡了。图 2C 和 2D 是用方法二筛选的结果。同样的供试细菌菌落接种在贫氮培养基上培养 36~96 h 后用尼罗蓝丙酮染液染色 10 min,待丙酮蒸发完,图 2C 为自然光下结果,后在紫外透射仪下观察(图 2D),亦有同样的 5 株菌落呈现粉红色亦或红色。相比较,方法二更快捷安全,且消除了染料对菌体生长的影响。利用上述方法筛选到 13 株产 PHAs 的阳性菌株,但产 PHAs 的细菌菌落粉红色有深有浅,可能和其产量有某种关系,有待进一步研究。



A: 筛选培养基中接种细菌培养物 36 h 自然光下菌落;B: A 培养物经紫外透射之下的菌落,显示粉红色及红色菌落为 PHAs 产生阳性菌落(圆圈标识的菌落);C: 贫氮培养基接种细菌培养物 36 h 后尼罗蓝染色液染色后自然光下的菌落;D: C 紫外透射下的菌落,红色为 PHAs 产生阳性菌落(圆圈标识的菌落);E: 筛选培养基接种细菌培养物 36 h 紫外光下图片,a 为阳性菌株,显示红色,但其生长受到抑制

图 2 尼罗蓝染色细菌菌落紫外透射前后颜色对比

2.3 尼罗蓝菌体染色结果

经尼罗蓝菌落染色法筛选后的阳性菌落再进一步进行菌体的尼罗蓝染色荧光显微镜镜检, 结果发现, 13 株阳性菌落的菌体荧光显微镜观察均亦发荧光, 但不同菌的发光强度有很大差异, 意味着在同一培养条件下, 不同菌的产 PHAs 的产量是有很大的差异的。如图 3 所示, A B C 3 个菌株中 B 发光信号最强, C 次之。通过荧光显微镜筛选后得到 7 株

PHAs 产量相对较高的菌株。本试验还发现同一菌株在不同培养条件下产 PHAs 的量是不一样的, 此项内容还有待进一步研究确定。

2.4 产 PHAs 阳性菌株生理特性检测结果

经过菌落和显微镜 2 次筛选, 得到 7 株 PHAs 产量相对较高的阳性菌株, 进而对其生理特性进行测定, 结果见表 1。



A,B:尼罗蓝染色荧光显微镜检阳性菌株; C:阳性对照
图 3 尼罗蓝染色细菌荧光显微镜观察结果(4000×)

表 1 产 PHAs 菌株的生理特性

菌株编号	革兰氏染色	芽孢	荚膜	鞭毛	大小/ μm (宽×长)	最适温度/ $^{\circ}\text{C}$	最适 pH	菌落形态
46	G—	—	+	—	1.05×2.04	40	6.0	圆形, 边缘锯齿, 表面湿润不透明乳白色, 菌落小
50	G+	+	—	—	1.01×1.84	20	6.0	圆形, 边缘整齐表面湿润不透明黄色, 菌落小
53	G+	+	—	—	1.09×1.53	20	6.0	圆形, 边缘整齐表面干燥不透明乳白色, 菌落大, 扁平状
56	G—	—	+	—	0.94×2.24	40	6.0	圆形, 边缘锯齿, 表面湿润不透明乳浅黄色, 扁平状
59	G—	—	—	+	1.02×1.91	40	6.0	不规则, 边缘波浪, 表面湿润不透明乳白色, 菌落大, 扁平状
61	G+	+	+	—	0.99×1.85	40	7.0	圆形, 边缘整齐表面湿润不透明浅黄色, 菌落小, 扁平状
129	G+	+	+	+	0.43×0.53	40	6.0	圆形, 边缘整齐表面湿润不透明浅红色, 菌落小

注: 表格中用“+”表示有, “—”表示无

3 结论与讨论

本试验采用已知产 PHAs 的真养产碱杆菌作阳性对照, 以从土壤中分离到的菌株做供试菌株, 进行了产 PHAs 菌株筛选方法的优化。结果表明: 苏丹黑染色法效果不佳。有试验表明, 聚羟链烷酸用苏丹族染料染色后, 用相差显微镜观察, 发现其在菌体内呈折射性颗粒^[7]。但本试验中由于细菌体小, 如果试验中苏丹黑染色液配置不好, 在油镜下黑色的染色液颗粒很难和菌体颗粒区分, 无法判断阳性菌株, 所以苏丹黑染料可能适用于菌体稍大的杆状细菌, 而不适用于球状细菌染色筛选。

试验还表明, 尼罗蓝染色法的确优于苏丹黑染色法, 在荧光显微镜下, 产 PHAs 的阳性菌株会产生橙黄色的光, 产量越高, 荧光越强, 但荧光会很快猝灭, 这种方法虽好, 但操作起来很繁琐, 而尼罗蓝平板菌落观察法则可以一边纯化分离细菌, 一边筛选, 大大减少了工作量, 快捷方便。

薛林贵等^[8]认为, 将尼罗蓝直接加入固体培养

基中, 这种荧光染料就能在细菌的生长过程中扩散进入细胞质中与 PHAs 结合, 尼罗蓝对细菌的生长和 PHAs 的累积都不产生负面影响。但在本试验中, 有部分菌株生长会受到尼罗蓝的影响, 最后菌体生长受到抑制(如图 2 中 E 图片 a)。所以本研究认为: 菌落长成后用 1% 尼罗蓝丙酮溶液避光染色 20 min, 待丙酮蒸发完后, 紫外照射观察, 就可以避免尼罗蓝对菌体生长的影响, 这种尼罗蓝染色筛选方法准确, 方便且快捷。在本试验中, 分离到 7 株产 PHAs 的阳性菌株, 其特性及产 PHAs 产量还有待于进一步深入研究确定。

此外, PHAs 菌体筛选还有一个关键的问题即培养条件的优化, 因为 PHAs 是在特定的 C/N 比失调的条件下积累的^[9-10], 所以, 试验中对于不同营养成分比例的掌握至关重要, 若营养比例不合适会影响菌体 PHAs 积累, 势必会导致漏筛, 同时产量的定位也会有偏差。关于高产 PHAs 阳性菌株的初筛至今仍然是一项难度较大的工作, 不仅要快捷简便的筛选, 关键是如何准确的定量(下转第 137 页)

- 药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2000:177.
- [7] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:21-22,152-153.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2010:28-29,205-206.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[S].第72卷.北京:科学出版社,1988:231-233,236-240,244-246.
- [10] 杨翠玲.易混品金银花与山银花的鉴别[J].山西中医学院学报,2006,7(4):48.
- [11] 林凯.福建金银花挥发油成分分析[J].江西农业学报,2009,21(5):102-104.
- [12] 张玲,彭广芳,钟方晓,等.山东金银花挥发油的化学成分分析[J].时珍国药研究,1996,7(2):89-91.
- [13] 刘家欣,谷宜洁.湘西金银花挥发油化学成分研究[J].分析科学学报,1999,15(1):66-69.
- [14] 邢学锋,陈飞龙,安春志,等.河南省密县金银花挥发油化学成分研究[J].第一军医大学分校学报,2005,28(2):114-115.
- [15] 粟时颖,郑兴,廖端芳.山银花研究进展[J].南华大学学报:医学版,2009,37(6):744-746,757.
- [16] 何兵,冯文字,田吉,等.四川泸州山银花挥发油化学成分气相色谱-质谱联用分析[J].时珍国医国药,2007,18(10):2368-2369.
- [17] 赵琰玲,尹莲.金银花化学成分与有效成分提取研究进展[J].医学导报,2007,26(5):521-523.
- [18] 于燕莉,石俊英.RAPD技术在金银花品种鉴定中的应用[J].中药材,2000,23(11):678-679.
- [19] 李萍,邢俊波.5S-rRNA基因间区序列变异用于金银花道地性研究初探[J].中草药,2001,32(9):834.
- [20] 杨飞,张敏,彭兴扬,等.金银花5个品系的RAPD分析及DNA指纹图谱的建立[J].武汉植物学研究,2005,25(3):235-238.
- [21] 向增旭,郭巧生.不同金银花种源间遗传关系的RAPD分析[J].植物资源与环境学报,2007,16(2):57-59.

(上接第89页)PHAs 阳性细菌 PHAs 的产量,还有待于进一步研究完善。

参考文献:

- [1] Feuilleley P, Cesar G, Benguigui L, *et al.* Degradation of polyethylene designed for agricultural purposes[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2005, 13(4): 349-355.
- [2] 李凌凌,吕早生,沈慧莉,等.产聚羟基烷酸的菌株分离及初步鉴定[J].武汉科技大学学报:自然科学版,2007,30(5):502-505.
- [3] 薛林贵,赵旭,景春娥,等.尼罗蓝在筛选 PHB 高产菌株中的应用研究[J].生物技术通报,2010(3):181-184.
- [4] 张咏.产聚羟基烷酸菌株的分离与鉴定[J].江苏石油化工学院学报,2000,12(4):18-19.
- [5] Kranz R G, Gabbert K K, Madigan M T. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(8): 3010-3013.
- [6] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2007.
- [7] 任世英,肖天.聚磷菌体内多聚物的染色方法[J].海洋科学,2005,29(1):59-63.
- [8] 薛林贵,赵旭,景春娥,等.我国 PHB 高产菌株诱变研究的新进展[J].应用化工,2009,38(11):1662-1666.
- [9] Jendrossek D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(6): 1186-1196.
- [10] Timm A, Steinbüchel A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(11): 3360-3367.