

极端嗜盐古菌的分离与纯化方法初探

陈绍兴¹, 刘毅¹, 谢昆¹, 田学军¹, 谢志雄²

(1. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661100 2 武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072)

摘要: 从一平浪盐矿采集到的一块盐矿石样品中分离到 2 株极端嗜盐古菌(命名为 CY1 和 CY2)。方法是用嗜盐培养基培养, 采用连续传代法和 NaCl 浓度(m/V)梯度法分离该样品中的极端嗜盐古菌, 结合平板划线纯化得到两株菌种。对分离得到的菌落进行观察, 结果表明已分离纯化得到的这两株菌种为极端嗜盐古菌。由此, 建立了分离纯化极端嗜盐古菌的一套可行的实验方法。

关键词: 极端嗜盐古菌; 连续传代法; NaCl 浓度(m/V)梯度法; 分离; 纯化

中图分类号: S939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2009)02-0291-02

盐古菌 [(Extremely halophilic archaea)] 通常称为嗜盐菌 (Halobacteria), 划分为古菌域 (Archaea) 的嗜盐菌目 (Halobacteriales) 下的嗜盐菌科 (Halobacteriaceae)。嗜盐古菌一般生长在盐湖、盐碱湖、死海、盐场、海洋以及盐腌制品表面等富盐环境^[1]。其中极端嗜盐古菌在盐浓度 15% ~ 30% 的介质中能良好生长, 最适盐浓度为 20% ~ 25%, 在饱和盐浓度中也能生长^[2], 这是一类只能在高盐浓度下才能生长并维持其结构稳定性与完整性的极端环境微生物, 属于古生菌域, 被称为第三生命形式^[3]。极端嗜盐菌多为圆形小菌落, 规则、湿润、有光泽, 菌落颜色多样, 一般有粉红、桃红、朱红、橙红等色, 镜检多为杆状、球状、三角形、方形以及多角形等各种形态^[4]。极端嗜盐古菌由于其特殊的结构特点和理化性质, 有广阔的应用前景。例如在环境生物治理方面用于高盐污水处理^[5-7]、盐碱地开发^[8-9]等, 也应用于生物电子领域^[10-11], 用于生产 PHB (聚-β-羟基丁酸)^[12]等药物工业^[13]。对极端嗜盐古菌的研究有巨大的潜在价值。

目前极端嗜盐古菌的分离方法主要有: 特殊选择培养基筛选法如 Gbbons 培养基^[14-15]和 CM 培养基^[14, 16]、分级稀释平板涂布法^[5, 16]等。本研究组利用连续传代法和 NaCl 浓度(m/V)梯度法, 从云南楚雄一平浪盐矿中分离到 2 株极端嗜盐古菌, 菌株命名为 CY1 和 CY2 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 样品的来源和处理

采集于云南楚雄一平浪盐矿的矿石样品, 放入浓度为 17.5% 的 NaCl 溶液中, 置于磁力搅拌器 (40 e, 200 r/min) 上, 溶解盐矿石得到样品原液, 备用。

1.2 培养基制作

嗜盐液体培养基参照文献 [17] 的方法制备总体积 1 000 ml 175 g NaCl 37 g MgSO₄, 3.7 g KCl 5 g Tryptone 3g Yeast

extract 25 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.2), 5 ml 10% CaCl₂ # 2H₂O, 17 L MnCl₂。250 ml 三角瓶装入 50 ml 液体培养基, 高压蒸汽灭菌器 121 e 灭菌 15 min, 嗜盐固体培养基, 每瓶装量 50 ml 添加琼脂粉 1 g 经 121 e 灭菌 15 min 倒平板, 50 ml/皿, 保存备次日之用。

1.3 极端嗜盐古菌的分离与纯化

1.3.1 连续传代法 按 1% 接种量, 将 1 ml 样品原液接入有嗜盐液体培养基的三角瓶中, 于 38 e、180 r/min 摇床培养箱中培养 2 周, 取该菌悬液 500 L 以同样条件传代至第 2 代, 同时做平板划线培养。如此连续传至第 5 代, 直到液体培养基呈橙红色, 并且平板上得到橙红色菌落。

1.3.2 NaCl 浓度梯度法 依照 Oflmer 的嗜盐培养基配方, 仅改变 NaCl 质量分数 (m/V), 分别配制 NaCl 浓度为 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35% 的液体培养基, 150 ml 三角瓶装量 50 ml 接入 1 ml 样品原液, 于 38 e、180 r/min 摇床培养箱中培养 2 周。

1.3.3 菌种纯化 将连续传代法和 NaCl 浓度梯度培养获得的红色菌悬液平板划线, 培养两周, 挑取橙红色菌落转移到新鲜嗜盐固体平板上划线培养。继续平板划线, 得到单一菌落。挑取单菌落, 转接到新鲜液体培养基中培养, 以获得较纯的极端嗜盐古菌。

2 结果与讨论

2.1 NaCl 浓度梯度法分离菌种

在较高浓度 NaCl 溶液的丰富营养的培养基中, 其他微生物由于不能适应很高的渗透压而不能良好生长或生长极其缓慢, 而极端嗜盐古菌只能生长较高盐浓度的环境。因此, 利用 NaCl 浓度梯度法, 不断提高 NaCl 的浓度, 使极端嗜盐古菌的生长占主导地位。从培养 1 周后的观察来看, 在 NaCl 浓度低于 10% 时, 基本无菌生长 (图 1-A, B); NaCl 浓度在 15% ~ 30% (2.6 ~ 5.1 mol/L) 时, 极端嗜盐古菌能大量生长, 菌悬液逐渐变红, 红色渐深 (图 1-C, D, E, F)。根据 Kushner 等^[2]提出的关于嗜盐微生物的划分方法, 最适生长盐浓度在 2.5 ~ 5.2 mol/L 范围内的称为极端嗜盐古菌, 据此进一步作最适盐浓度测定推断, 本样品所分离到的细菌可能为极端嗜盐古菌。

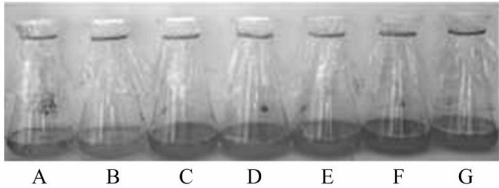
2.2 连续传代法分离菌种

通过不断传代培养, 逐步淘汰其他微生物, 而只有极端嗜

收稿日期: 2008-10-30

基金项目: 红河学院生物化学与分子生物学重点学科建设项目 (编号: 071010)。

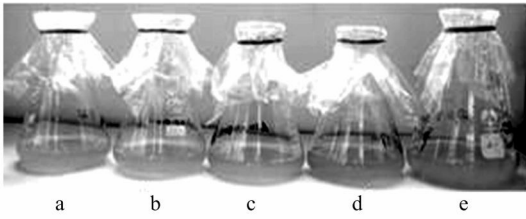
作者简介: 陈绍兴 (1979), 男, 浙江龙游人, 硕士研究生, 讲师, 现从事微生物遗传方向研究。Tel (0873) 3698575; E-mail shaoxinch@ yahoo.com.cn



将原液以1%的接种量接种在同一批装量为50 ml的不同盐浓度的嗜盐液体培养基中,培养2周。NaCl浓度(m/V)分别为A: 5%; B: 10%; C: 15%; D: 20%; E: 25%; F: 30%; G: 35%

图1 极端嗜盐古菌的NaCl浓度梯度法分离纯化

盐古菌得到较好生长,并富集。在第1、2、3次传代时,极端嗜盐古菌以及其他少数微生物生长,并且其他微生物逐渐减少,极端嗜盐古菌增多(如图2-a、b、c);当传至第4代时,极端嗜盐古菌占主要部分,菌悬液变为红色(如图2-d);当第5次传代以后,菌悬液红色更明显,并且能在接近20%的盐浓度培养基中生长,基本上已经分离到较纯的极端嗜盐古菌(如图2-e)。

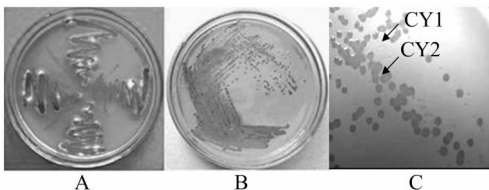


将原液接入第1次的嗜盐培养基,培养2周,为第1代,再以此为传代基础,按1%接种量接入新培养基,作为2次传代,依次传代,培养条件均相同。a: 1次传代; b: 2次传代; c: 3次传代; d: 4次传代; e: 5次传代

图2 极端嗜盐古菌的连续传代法分离纯化

2.3 平板划线分离纯化菌种

将上述分离所得的极端嗜盐古菌菌悬液平板划线,38℃下倒置培养2周,分离单个菌落。经过连续多次平板划线,得到两种大小和形态不同的菌落(如图3-A、B):大菌落直径为2 mm,小菌落直径为0.2 mm,两种菌落均为橙红色、突起、光滑、边缘整齐。将图3-B进行局部放大,如图3-C所示。在同样培养条件下,于嗜盐古菌的固体平板上得到两种菌落形态和直径大小有较大差异的橙红色单个菌落,基本可以确定为两种不同的极端嗜盐古菌,暂时把菌落形态较大的命名为CY1,较小的为CY2。



A: 将第5次传代的菌悬液在嗜盐固体平板上划线,38℃倒置培养2周; B: 挑取红色菌落在新平板上划线,38℃倒置培养2周,得到单菌落; C: 为B图的局部放大, CY1为大菌落, CY2为小菌落。

图3 极端嗜盐古菌的平板划线分离纯化

目前对极端嗜盐古菌的分离培养都集中在培养基的制作与改良上,如前所述的 Gbbms培养基以及改良配方^[5 14-15]、CM培养基^[5 18],另外还有很多各种配方的嗜盐培养基^[19],说明了其分离方法多种多样。但是培养嗜盐古菌的操作方法较

单一,如稀释平板涂布法^[5 18]。然而,对极端嗜盐古菌的分离纯化很少有专门的研究报导。

我们采用连续传代法和 NaCl浓度梯度法富集培养,再结合平板划线,从云南楚雄—平浪盐矿矿石中分离并纯化了两株极端嗜盐古菌,同已报道的现有分离方法相比较,建立了一套从盐矿分离、纯化极端嗜盐古菌的较为系统、有效的分离方法,为研究盐矿中的极端嗜盐古菌群落的生态分布和进一步分离得到在环境生物治理、盐碱地开发、生物电子领域、药物工业等方面有较好应用价值的工程菌株奠定基础。为更好地开发极端环境的微生物资源提供了有效的分离和纯化手段。

参考文献:

- [1]周培谨.嗜盐细菌[J].微生物学通报,1989,16(1):31-34
- [2]Kushner D J. Microbial life in extreme environment London[M]. London Academic Press, 1978: 317-368
- [3]Woese C R, Kandler Q, Wheelis M L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87: 4576-4579
- [4]吕爱军,刘耀民,华栋,等.盐田中嗜盐菌的初步研究[J].海洋科学,2003,27(12):5-6
- [5]Davis E M, Petros J K, Powers E L. Powers organic biodegradation in hypersaline wastewater [J]. Industrial Waste, 1997, 22-25
- [6]文湘华,古新民,王建龙,等.含盐废水的生物处理研究进展[J].环境科学,1999,20(3):104-106
- [7]安立超,严学亿.嗜盐菌的特性与高盐废水生物处理的进展[J].环境污染与治,2002,24(5):293-296
- [8]Birge R R. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin [J]. Biophys J, 1990, 58(1): 293-327
- [9]Woolard C R, Irvine R L. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor [J]. Water Research, 1995, 29(4): 1159-1168
- [10]Tian Yanning, Feng Xiaoqiang, Chen Feng, et al. Photonic Switch based on bacteriorhodopsin [J]. J of Applied Optics, 2001, 22(2): 46-49
- [11]Liu Wei-min, Chen Feng, Yang Qing, et al. The absorption and the scattering in the high resolution image storage using Bacteriorhodopsin Film [J]. Acta Photonica Sinica, 2002, 31(1): 125.
- [12]Shi Hai-ping, Su Tao. Study on microbial fermentation of collecting for poly-β-hydroxybutyrate [J]. Food and Fermentation Industries, 1998, 24(2): 79-82
- [13]吕爱军,胡斌.极端嗜盐菌的特性及其应用前景[J].微生物学杂志,2005,25(2):65-68
- [14]王大珍,周培谨.极端嗜盐菌新种的鉴定[J].微生物学报,1984,24(4):704-709
- [15]田新玉,周培谨.嗜盐嗜碱杆菌的一个新种[J].微生物学报,1997,37(1):1-6
- [16]惠寿年,吴爱过.极端嗜盐菌色素的研究[J].新疆大学学报,1997,14(3):57-63
- [17]Offner S, Wanner G, Pfeifer F. Functional studies of the gypACNO operon of Halobacterium salinarum. Reveal that the GypC protein shapes gas vesicles [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(7): 2071-2078
- [18]迪丽拜尔·托乎提,徐晓晶.艾丁湖极端环境中嗜盐菌的研究[J].干旱区研究,1999,16(1):25-28
- [19]田新朋,李文均.云南黑井古盐矿可培养极端嗜盐古菌初步研究[J].微生物学通报,2006,33(6):1-7