

产琼胶酶海洋细菌的分离、鉴定及其分解琼胶实验

王祥红 贾仁洁 张超 汤志宏

(中国海洋大学海洋生命学院 山东青岛 266003)

摘要 产琼胶酶的细菌和琼胶酶在制备原生质体、回收DNA与RNA和产生琼胶寡糖等有着重要的用途。从石花菜和江蓠等植物表面分离产琼胶酶的海洋细菌并进行纯化,经分子生物学、形态学与生理生化实验鉴定,分离菌株为假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)。将该菌在2216E培养基平板上划线或点种培养,可见平板出现凹陷现象;滴加碘液后,可见菌落周围有透明圈,表明菌落周围的琼胶被分解掉了。此法更容易分离得到产琼胶酶的菌株,分解琼胶的实验现象明显,便于观察。

关键词 琼胶 海洋细菌 琼胶酶 海洋细菌 假交替单胞菌

中国图书分类号:Q331 文献标识码:B

琼胶(agar,或称琼脂、冻粉、洋菜)是由琼脂糖(agarose,约占70%)和琼脂胶(agarpectin,约占30%)组成,琼脂糖是由(1→3)-O-β-D-半乳糖和(1→4)-O-3,6-内醚-α-L-半乳糖交替组成的线形链状分子;琼脂胶由复杂的长短不一的半乳糖残基的多糖链组成,其中包含有多种取代基如硫酸基、甲基等,对于其结构的细节还不十分清楚。天然琼胶主要存在于某些海藻的细胞壁中,因此琼胶主要是从石花菜、江蓠等红藻植物提制的。琼胶的化学性质稳定,一般的微生物不能分解利用;就物理性质而言,琼胶在95℃以上开始熔化,熔化后的琼胶在冷却到45℃时重新开始凝固,所以琼胶是在微生物的培养基中应用最广的凝固剂。

某些细菌能够产生琼胶酶将琼胶分解成小分子的物质,由于琼胶被分解,这些细菌的菌落周围会出现凹陷或液化。能产生琼胶酶的细菌主要来自于海洋,还有一部分来自河流、土壤和污水中。能够分解琼胶的细菌主要为弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和交替单胞菌属(*Alteromonas*)的细菌,它们常常分布于海洋中的红藻如石花菜和江蓠等植物上,因此从海洋的红藻如石花菜和江蓠等植物的表面常常能分离到产琼胶酶的细菌。

由于琼胶是许多红藻的细胞壁的重要组成部分,因此琼胶酶可以作为大型海藻酶解的工具酶,来获得单细胞或原生质体,所以开发微生物来源的琼胶酶具有重要的实际应用价值。琼胶酶可以

应用于分子生物学方面回收琼脂糖凝胶中的DNA和RNA;琼胶酶也可以分解某些海藻的多糖,测定其水解产物的结构,进而推测多糖的结构;琼胶酶也用来分解多种海藻多糖产生琼胶寡糖,而一定分子量的琼胶寡糖分别具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫力等多种作用。

本文利用无菌操作技术从海藻中分离产琼胶酶的海洋细菌,接种于相应的琼胶培养基上来观察其分解琼胶的现象,现象非常明显,取得良好实验效果。

1 分离

无菌操作取石花菜或江蓠20g,用无菌镊子夹起石花菜在无菌海水中漂洗2~3次,洗去石花菜表层黏附的外来污物;将洗过的石花菜切成1~2mm³的小块,放入250mL三角瓶内(内装80mL无菌海水及玻璃珠8~10粒),振荡15min,使表层的细胞悬浮于海水内,静置片刻。用定量移液器移取1mL上清液,加入到9mL的无菌海水中进行系列稀释,制成10⁻¹、10⁻²、10⁻³等一系列稀释菌悬液。用移液器移取不同稀释度的菌悬液各0.1mL分别涂布于2216E海洋琼脂平板上(蛋白胨5g,酵母膏1g,磷酸铁0.1g,琼脂20g,陈海水1000mL,pH7.6,121.3℃灭菌20min。),每个稀释度涂布2~3个平板,将平板于28℃温箱中倒置培养2~7d,每天观察细菌的生长情况,菌落周围出现凹陷的细菌即为产琼胶酶的海洋细菌。

2 纯化

得到的菌株需要进一步纯化,用接种环挑取周围出现凹陷的细菌菌落,在2216E海洋琼脂平板上不断划线,培养后得到菌落特征一致的菌落即为纯种。将纯种的细菌接种于斜面上,于28℃温箱培养2 d,用含有12%~15%甘油的生理盐水洗涤斜面制成保种菌悬液,将菌悬液置于-20℃冰箱保种。

3 培养

将纯化的产琼胶酶的细菌菌种进行无菌操作,在2216E固体培养基平板上划线或点种,或在2216E半固体培养基(蛋白胨5 g,酵母膏1 g,磷酸铁0.1 g,琼脂5 g,陈海水1 000 mL,pH7.6,121.3℃灭菌20 min。)试管中穿刺,置于28℃温箱培养2 d。

4 观察

取培养好的培养基进行观察,因为细菌产生的琼胶酶使菌落周围的琼胶分解,可以见到在平板划线产生的单菌落或点种培养的菌落上有菌落凹陷现象,凹陷严重的可使平板开裂下陷(见图1,图2)。在培养好培养基平板上加入一层卢哥氏碘液(碘1.0 g,碘化钾2.0 g,蒸馏水300.0 mL)并摇匀,琼胶遇碘颜色加深,琼胶被分解的地方颜色变浅,可观察到在细菌菌落周围有透明圈出现(见图3和图4)。将细菌在半固体培养基中培养后,可见到试管上部的琼胶被液化,说明琼胶被细菌分泌的琼胶酶分解了。

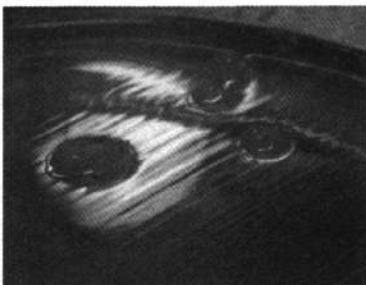


图1 产琼胶酶的细菌菌落使培养基产生凹陷

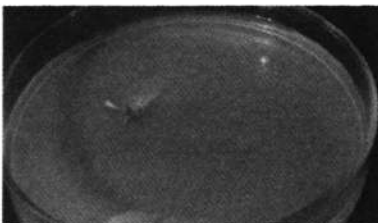


图2 产琼胶酶的细菌菌落使培养基开裂并产生凹陷

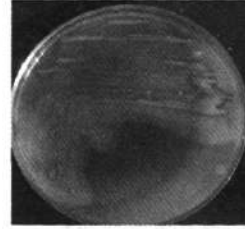


图3 划线的平板上加入碘液后菌落周围的透明圈

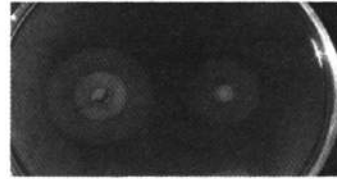


图4 点种的平板上加入碘液后菌落周围的透明圈

5 菌种鉴定

该菌为革兰氏染色阴性,不产生芽孢,其生理生化特征是接触酶、氧化酶阳性、能够利用葡萄糖、乳糖和木糖产酸。该菌的16SrDNA序列(GenBank 登录号为HQ834709)分析与假交替单胞菌相似度大于98%,初步鉴定为假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)。

6 注意事项

利用本方法可以比较容易地从石花菜、江蓠等红藻植物的表面分离到产琼胶酶的细菌,但是应当注意在取样操作和分离菌种时要严格进行无菌操作,以免杂菌污染。另外,在选取藻类样品时应选取新鲜生长的藻,不能选取腐烂的藻体,这样的藻体会有大量的腐败细菌,不利于分离产琼胶酶的细菌。

7 讨论


在海水和海泥中也存在有产琼胶酶的细菌,因此从海水和海泥里也可以分离到产琼胶酶的细菌,但因数量较少,较不易分离得到。而石花菜、江蓠等红藻植物本身含有琼胶可以被产琼胶酶细菌利用,产琼胶酶的细菌更容易大量存在,因此在这些藻类表面更容易分离到产琼胶酶的细菌。

主要参考文献

- 1 杜宗军,王祥红,李筠等. 琼胶酶研究进展. 微生物学通报, 2003,30(1):64-67.
- 2 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社,1999.
- 3 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京:高等教育出版社、施普林格出版社,2001.

(E-mail:wangxianghong67@yahoo.com.cn)

产琼胶酶海洋细菌的分离、鉴定及其分解琼胶实验

作者: [王祥红](#), [贾仁洁](#), [张超](#), [汤志宏](#)
作者单位: [中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛, 266003](#)
刊名: [生物学通报](#) 
英文刊名: [BULLETIN OF BIOLOGY](#)
年, 卷(期): 2011, 46(5)

参考文献(3条)

1. [杜宗军](#); [王祥红](#); [李筠](#) [琼胶酶研究进展](#) [期刊论文]-[微生物学通报](#) 2003(01)
2. [沈萍](#); [范秀容](#); [李广武](#) [微生物学实验](#) 1999
3. [黄秀梨](#) [微生物学实验指导](#) 2001

本文读者也读过(10条)

1. [朱启忠](#), [朱慧文](#), [孙艳娜](#), [周晓龙](#), [郝梅](#), [郭振博](#), [ZHU Qizhong](#), [ZHU Huiwen](#), [SUN Yanna](#), [ZHOU Xiaolong](#), [HAO Mei](#), [GUO Zhenbo](#) [海洋细菌Agarivorans albus NBRC102603琼胶酶的分离纯化](#) [期刊论文]-[生物加工过程](#)2011, 09(3)
2. [问莉莉](#), [董静静](#), [李思东](#), [WEN Li-li](#), [DONG Jing-jing](#), [LI Si-dong](#) [琼胶寡糖的制备及其应用研究进展](#) [期刊论文]-[山东化工](#)2011, 40(5)
3. [刘美英](#), [梅建凤](#), [应国清](#), [王鸿](#) [一株海洋琼胶酶产生菌的分离、筛选和初步鉴定](#) [会议论文]-2008
4. [陈海敏](#), [严小军](#), [郑立](#), [张伟伟](#), [林伟](#) [琼胶的降解及其产物的分析](#) [期刊论文]-[郑州工程学院学报](#)2003, 24(3)
5. [王静雪](#), [江晓路](#), [牟海津](#), [管华诗](#), [WANG Jing-xue](#), [JIANG Xiao-lu](#), [MU Hai-jin](#), [GUAN Hua-shi](#) [海洋弧菌QJH-12发酵产琼胶酶条件的优化](#) [期刊论文]-[海洋科学](#)2007, 31(7)
6. [张千](#), [曾润颖](#), [ZHANG Qian](#), [ZENG Run-ying](#) [厦门沿岸海域杂色鲍中产琼胶酶菌株的筛选及其酶学性质的研究](#) [期刊论文]-[台湾海峡](#)2011, 30(2)
7. [梅建凤](#), [应国清](#), [刘美英](#), [易喻](#), [陈建澍](#), [王鸿](#), [MEI Jian-feng](#), [YING Guo-qing](#), [LIU Mei-ying](#), [YI Yu](#), [CHEN Jian-shu](#), [WANG Hong](#) [酶解琼胶制备活性寡糖的工艺条件研究](#) [期刊论文]-[浙江工业大学学报](#)2011, 39(2)
8. [时岩玲](#), [于文功](#), [路新枝](#), [SHI Yan-ling](#), [YU Wen-gong](#), [LU Xin-zhi](#) [海洋紫色杆菌β-琼胶酶的分离纯化及性质](#) [期刊论文]-[武汉大学学报\(理学版\)](#) 2008, 54(4)
9. [刘江涛](#), [蔡俊鹏](#), [吴冰](#), [Liu Jiang-tao](#), [Cai Jun-peng](#), [Wu Bing](#) [琼胶酶及其综合应用的研究概况](#) [期刊论文]-[现代食品科技](#)2005, 21(1)
10. [吴国汉](#) [琼胶酶生产菌的筛选、鉴定及其产酶条件的优化](#) [学位论文]2011

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_swxtb201105020.aspx