

一株光合细菌分离与初步鉴定*

董艳珍, 陈碧华, 肖文渊

(西昌学院 动物科学学院, 四川 西昌 615013)

【摘要】从西昌学院北校区养鱼池的底泥中富集分离得到一株光合细菌,该菌株厌氧培养物为红色,革兰氏染色呈阴性,繁殖方式为二均分裂。通过形态学观察及生理生化特性鉴定,鉴定为该菌株属于红假单胞菌属。

【关键词】光合细菌;富集;分离;鉴定

【中图分类号】S917.1 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2010)03-0006-02

光合细菌(*Photosynthetic Bacteria*)是自然界中能以光合作用产能的细菌,是地球上最早出现的具有原始光能合成体的原核生物。光合细菌包括有27属、66种。光合细菌生理类型的多样性使它成为细菌中最复杂的菌群之一,在不同的自然环境下,能表现出不同的生理生化功能,如固氮、脱氢、硫化物氧化等,这使得光合细菌在自然界的氮、碳、硫循环中发挥着重要作用,具有重要的科学研究价值。

研究表明,光合细菌在养殖业、种植业、环境治理、新能源开发利用等应用领域具有十分广阔的前景。在水产养殖业中,光合细菌可以改善水质,稳定养殖环境,增进鱼虾的免疫力,预防疾病。同时,光合细菌的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丰富,可作为鱼虾的饵料及饵料添加剂。凉山州内水产养殖者也广泛使用光合细菌用于水质调节,但都是直接购买商品光合细菌,还未见有从本地分离光合细菌用于水产养殖的报道。本研究拟从西昌市养鱼池塘中分离出光合细菌,并进行了初步形态学鉴定和生理生化鉴定,为光合细菌应用于凉山州水产养殖业提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 底泥

西昌市西昌学院北校区家鱼养殖池的底泥。

1.2 培养基

使用红螺菌科富集培养基和分离培养基。

富集培养基成分: KH_2PO_4 0.5g; CH_3COONa 3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05g; 酵母膏 0.05g; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$ 0.3g; K_2HPO_4 0.3g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3g; NaCl 0.1g; pH 7.2; 蒸馏水 1000ML。

分离培养基成分: 酵母膏 3g; 蛋白胨 3g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; pH 6.8; 蒸馏水 1000mL。

1.3 仪器与设备

生化培养箱、高压蒸汽灭菌锅、紫外可见分光光度计。

1.4 富集与分离

1.4.1 富集

取20g生长有光合细菌的泥样,放于无菌250mL三角瓶中。加入液体富集培养基200mL,与泥样振荡混匀,液面注入0.5cm高灭菌液体石蜡,棉塞封口,造成厌氧环境。在温度28℃、光照5000lx的生化培养箱中培养至培养液呈红棕色。移取红棕色光合细菌的富集液1mL至装有富集培养液5mL的试管中,液面注入0.5cm高灭菌液体石蜡,保持厌氧条件。连续富集3次,使欲要分离的光合细菌成为优势种。

1.4.2 分离

取富集后的红色光合细菌液在分离培养基平板上划线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。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 菌落及菌体形态观察

观察琼脂分离平板上生长的菌落形态;对菌体进行革兰氏染色,显微镜下观察菌体形态并测定菌体大小。

1.5.2 活细胞吸收光谱测定

取5mL液体培养物经3000r/min,用生理盐水洗涤两次,重新悬浮于60%的蔗糖溶液中,定容至10mL,用60%的蔗糖溶液作为空白对照,用分光光度计在波长360~840nm范围测定细菌的吸光值,绘制吸光度曲线。

1.5.3 生理生化特性

对所得菌株进行生理生化特性鉴定:接触酶实验、 H_2S 生成实验、吲哚实验、硝酸盐还原实验、明胶液化实验、淀粉水解实验。

收稿日期:2010-05-02

*基金项目:四川省教育厅青年基金资助项目。

作者简介:董艳珍(1977-),女,硕士,讲师,主要从事水产养殖教学和研究工作。

2 结果与分析

2.1 光合细菌富集和分离

放有养鱼池塘底泥的富集培养液7d后开始变成微红,随时间延长,培养液颜色逐渐加深,20d后富集培养液变为深红色。第二次和第三次富集时,菌体生长快,一周左右培养液颜色变为深红色。取呈深红的富集液进行稀释,经多次平板划线分离,得到一菌株。

2.2 菌株的初步鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态观察

分离所得菌株菌落在厌氧条件下为圆形深红色菌落,菌落表面微光滑、突起、湿润、有光泽、不透明,菌落边缘整齐。

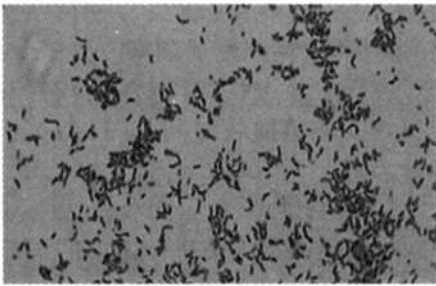


图1 菌体形态(1000×)

革兰氏染色表明该菌株为革兰氏阴性菌。光学显微镜下细菌形态见图1,细菌细胞为杆状,长明显大于宽,大小为 $0.4 \sim 1.0 \times 1.9 \sim 3 \mu\text{m}$ 。

2.2.2 活细胞吸收光谱测定

光合细菌活细胞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见图2,从图2中可知该菌株在380nm、460nm、600nm、800nm、860nm

处存在吸收峰值。

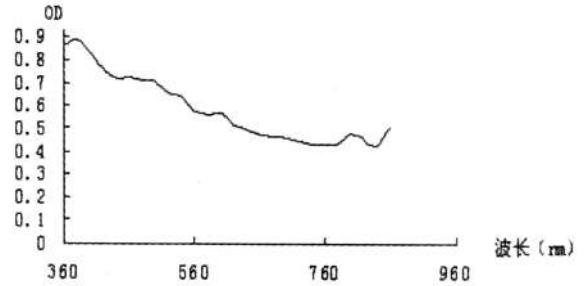


图2 菌株活细胞吸收光谱

2.2.3 菌株的生化特性

对该菌株的生化特性鉴定结果见表1。从表1可知该菌株接触酶实验、 H_2S 生成实验、硝酸盐还原实验为阳性;吲哚实验、明胶液化实验、淀粉水解实验均为阴性。

表1 菌株的生理生化特性

接触酶 试验	H_2S 生成 试验	吲哚 实验	硝酸盐 还原试验	明胶 液化试验	淀粉 水解试验
+	+	-	+	-	-

注:+为阳性反应;-为阴性反应

以《常见细菌系统鉴定手册》为依据,根据菌株的细胞形态、培养、生理生化、活细胞吸收光谱等特征,鉴定分离菌株属于红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)。

光合细菌菌株的鉴定除了采用传统的形态学特征、生理生化特征外,还应结合其他的分类鉴定依据,如核酸的碱基组成 $[(\text{G}+\text{C})\%]$,分子杂交等分子生物学手段,只有这样才能鉴定到种,这有待于以后的研究。

注释及参考文献:

- [1]成永旭.生物饵料培养学(第二版)[M].北京:北京中国农业出版社,2005:15-38.
- [2]东秀珠,蔡妙英,等.《常见细菌系统鉴定手册》[M].北京:北京科学出版社,2001:28,349-399.
- [3]李勤生,卫翔,王若雪,等.光合细菌H3菌株的分离及生物学特性研究[J].水产生物学报,1999,23(1):18-23.
- [4]钱大益,朱益丹,宋存义,等.光合细菌的生长条件[J].北京科技大学学报,2005,27(2):156-158.
- [5]沈锦玉,刘问,尹文林,等.光合细菌菌株HZPSB的分离鉴定及其生长特性的测定[J].科技通报,2005,21(1):69-73.
- [6]史清亮,杨素萍.PSB生物肥料的研制及其应用效果[C].葛成.微生物肥料的生产应用及其发展:95全国微生物肥料专业会议论文集.北京:中国农业科技出版社,1996:100-103.
- [7]IMHOFF J F, PETRI R, SUL ING J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the α -proteobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 793-798.
- [8]YURKV V V, BEATTY J T. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (3):695-724.

Isolation and Identification on One Strain of Photosynthetic Bacteria

DONG Yan-zhen, CHEN Bi-hua, XIAO Wen-yuan

(Animal Science Faculty, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

注释及参考文献:

- [1]叶廷飞,温根龙,付良彬,等.颗粒饲料对育肥山羊增重的研究[J].中国草食动物,2005(6):39-41.
- [2]陈林,毛德柱,李观题.羊用饲料添加剂对山羊增重的影响[J].饲料与畜牧,2002(6):18-19.
- [3]左学斌.山羊补饲生长发育观察[J].畜禽业,1999(03):46-47.
- [4]夏桂林,陆晓平,杨育才,等.云岭黑山羊补饲育肥试验[J].中国畜牧杂志,2004(11):51-53.

The Study on the Effects of Grazing and Supplementary Feeding on Fattening Jiangtang Black Goat Hybrids

AKu Ri-ga¹, WANG Tong-jun², SHE Lu-jun²

(1.Haogu Grass Field of Zhaojue County, Zhaojue, Sichuan 616150;

2.Liangshan Prefecture Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Xichang, Sichuan 615042)

Abstract: Under grazing condition, different amounts of supplementary feeding were set (group II 200g, group III 250g) to feed Jinben goat hybrids which produced a significant effect on gaining weight. Compared with CK group I, the daily increased weight were 108.33g and 124.56g respectively, which increased by 65.35g and 81.58g compared with the experimental group I(42.98g), respectively.

Key words: Jintan black goats hybrid; Supplementary feeding; Fattening

(上接5页)

Yunyan 85, followed by the red flowers large Jinyuan, while the K326 is the lowest. However, taking into account the enterprise purchase policy, the authors propose the local farmers mainly grow Yunyan 85 and the red flowers large Jinyuan, along with some Yunyan 87 and Yunyan 97, which can get more economic returns.

Key words: Tobacco; Variety; Quality; Economic value; Compare

(上接7页)

Abstract: One strain of photosynthetic bacteria was enriched and isolated from fish pond sediment in Xichang college. This Gram-negative strain has red anaerobic culture and binary division. The morphology and physiological-biochemical characteristic of this strain showed it belongs to Rhodospseudomonas.

Key words: Photosynthetic bacteria; Enrichment; Isolation; Identification