

利用原生质体技术选育聚 β -羟基丁酸高产菌株的研究*

薛林贵 王维国 姜双林

(庆阳师范高等专科学校生物系 西峰 745000)

摘要 从六份城市生活污水样品中,分离筛选出一菌株,具如下主要特征:杆菌,0.85~1.2 \times 2.0~5.0 μ m;革兰氏染色阴性;具荚鞘,细胞包在鞘里,丝状体很长,但无分枝;亚端生鞭毛;胞内具 PHB 颗粒和异染颗粒;液化明胶微弱;菌落为光滑型和丝状两种。经鉴定该菌株为浮游球衣细菌(*Sphaerotilus natans*)。该菌在 28 $^{\circ}$ C 条件下生长良好,细菌细胞大,PHB 颗粒很大,有的可以充满整个细胞。经培养的菌种于培养液中在室温下保存近一年,方法简便效果好。

关键词 球衣细菌,分离,鉴定,PHB

分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0172-175

STUDY ON THE SELECTION OF HIGH-YIELD PHB PRODUCING STRAIN BY TECHNIQUE OF PROTOPLASTS

Xue Lingui Wang Weiguo Jiang Shuanglin

(Department of biology, Qingyang College, Xi Feng, 745000)

Abstract A Strain of *sphaerotilus natans* from six polluted water samples was isolated. The strain has some main features as follows: bacillus, 0.85~1.2 \times 2.0~5.0 μ m; Gramnegative bacteria; it has sheath that cells in it, the hypha is vary long but no divarication; subterminal-flagellum; there are metachromatic granules and PHB granules in cells; there are two kind of colony, the one is smooth, and the other is silk. The strain can grow properly

* 甘肃省教委科研基金资助项目(965-08号)

1998-04-20收稿,1998-12-09修回

under condition 28°C and produce big PHB granules.

The strain was kept in cultivating liquid under home temperature near to a year, this is a good and handy way.

Key words *Sphaerophilus*, isolation, identification, PHB.

聚β-羟基丁酸(PHB)是细菌细胞内积累的一种能被微生物的酶所降解的高分子聚合物,作为细胞内的能量和碳源物质。自1926年法国的Lemoigne M.首先在*Bacillus megatherium*细胞中发现PHB以来,各国学者对其进行了大量研究^[1-3]。在废弃的化学塑料带来严重的“白色污染”日趋严重的今日,一种新的塑料替代品PHB更成为人们研究的热门课题。PHB的性质与目前普遍使用的聚丙烯相似,但其透氧率低,抗紫外线照射,无免疫性,尤其是其共聚物弹性高,生物降解速度快等是其特点,因而PHB正被作为易降解塑料应用于医疗和工农业生产上^[1,3]。

现已知道,许多属、种的细菌可在胞内积累PHB^[5],球衣细菌是其成员之一。它又是参与污水处理的重要菌种,所以利用球衣细菌生产PHB可一举两得。球衣细菌的分离纯化是一项难度较大的技术工作,我们通过低营养富集、特征菌落的培养、高营养培养单细胞等分离纯化出目的菌,并进行了细菌学鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品采集

西安生活污水的活性污泥1份,西峰生活污水的活性污泥2份,平凉生活污水的活性污泥1份,兰州生活污水的活性污泥2份。

1.2 培养基

富集培养基:尿素0.5g,葡萄糖1g, MgSO₄ 0.05g, K₂HPO₄ 0.1g, 定容1L水中, pH7.0。

分离培养基(S培养基):牛肉膏0.5g,葡萄糖0.2g,琼脂20g,定容1L水中。

CGY琼脂培养基(C培养基)^[2]:甘油10g,酵母膏1g,蛋白胨5g,琼脂18g,定容1L水中。

肉汤培养基:牛肉膏3g,蛋白胨10g, NaCl 5g,琼脂18g,定容1L水中。

1.3 菌种分离及筛选

活性污泥经富集培养后,用平板划线和稀释平板等方法分离,肉汤培养基作无杂菌试验。

1.3.1 富集培养:吸取活性污泥5mL,接于50mL富集培养液中,静止培养30~48h。将漂浮于液面上的半透明絮状团块经镜检后进行分离。

1.3.2 分离及筛选:将上述团块挑出,在无菌水中连续洗涤,然后在分离培养基上划线,28°C培养30h,见有丝状体伸展时,及时挑取,再重复划线,可得到初步纯化的菌株。然后将其在CGY平板上划线分离,可获得纯种。

1.3.3 单菌分离:常有杂菌粘附于鞘外,故球衣细菌的分纯较难。由于在C培养基上可获得大量单菌体,因此,将C培养基斜面上初步分纯的菌制成菌悬液,稀释涂布S平板,可得到纯化。也采用过滤法将菌丝体除去,将单菌体稀释涂布S平板,获得单菌落。

1.4 PHB贮藏物质的观察及定性

1.4.1 菌体生长:浊度比色法测定C培养液。

1.4.2 PHB颗粒分析:苏丹黑染色^[1], PHB颗粒呈蓝黑绿色,菌体红色。

2 结果与讨论

2.1 PHB产生菌的分离与筛选

分别取采来的样品经富集培养后按上述方法分离,镜检PHB颗粒的大小作为筛选标准,初选出28株,经复筛选出PHB颗粒最大,含PHB细胞所占比例最高的8号菌株作为试验株,定名为G₈菌株。

2.2 G₈号菌株的鉴定

2.2.1 培养特征:G₈号菌在S平板上菌落扁平,无光泽,呈典型的丝状菌落(图1-4)。在C平板上菌落表面光滑,边缘整齐,呈光滑型菌落。在

S培养液中培养,液体澄清,形成菌膜,摇动时不易破裂,粘附于管壁,挑取培养物时收缩成粘液团。在C培养液中培养,不形成菌膜,丝状体悬浮于液体中。

2.2.2 形态特征:将在培养基上培养40h的菌株进行染色观察,结果见表1。

表1 G₈菌形态特征

鉴定项目	形态特征
菌体形状	杆状,两端钝圆(图1-2),无芽孢;革兰氏染色阴性。
菌体大小	1.0~1.5×2.0~5.0μm
衣 鞘	薄而无色,空鞘宽1.5~2.3μm,当细菌丝状体有缺位时,非常明显,有粘性,游离的单菌体常附于其外。
鞭 毛	为一小束,似单根鞭毛,亚端生(图1-3)。
运 动	游离单菌能活跃运动。
假分枝	细胞包在鞘中,丝状体很长,偶然见假分枝。
铁的沉积	鞘外未见有铁的沉积。
异染颗粒	用吕氏美蓝染色有的异染粒较大,占菌体的1/3,有的细胞含几个颗粒。
PHB颗粒	苏丹黑染色,菌体内含嗜苏丹黑B颗粒1~4个,占菌体的3/4(图1-1)。

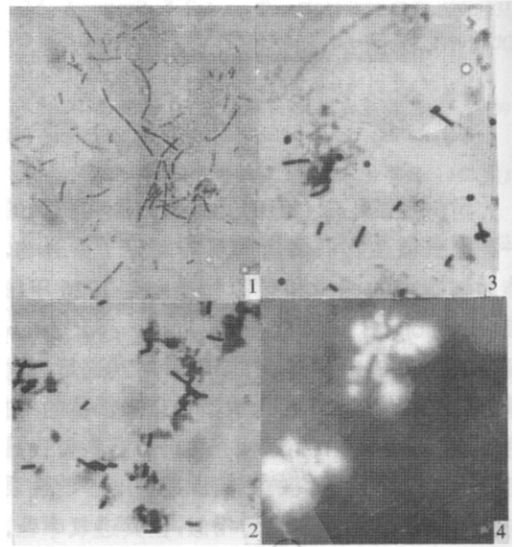


图1 G₈菌的形态特征

1. 示PHB颗粒,(990×);
2. G₈菌的形态,(990×)
3. 示鞭毛,(990×);
4. G₈菌的丝状菌落。(20×)

盐还原反应阳性。

2.2.4 对糖和有机酸的利用:结果见表2。

根据 Bergey 细菌学鉴定手册第八版及以上鉴定结果,G₈菌鉴定为球衣细菌属的浮游球衣细菌(*Sphaerotilus natans*)。

2.3 G₈菌的菌种保藏

2.3.1 斜面保藏法:在C培养基上培养54h的G₈菌,在0℃~4℃保存,仅存活两个月,保存时间延长,死亡率显著升高,保存90d,成活率为80%。

2.3.2 液体保藏法:将G₈菌经液体培养法培养后,滴加(1mL)到10mL C培养基或灭菌蒸馏水中保存,效果很好,现已存活十个月,保存300d,成活率仍达98%。

球衣细菌的分离纯化是一项难度较大的工作,掌握单细胞的释放时期从而获取单细胞是该项工作的关键。分纯的目的菌的产PHB性能需进一步测定并加以改造。由于球衣细菌没有芽孢,存活期短。该实验证明,C培养液和灭菌蒸馏水的液体保存法是非常有效的方法。

2.2.3 生化反应特征:生理生化反应结果表明,G₈菌的淀粉水解、吡啉形成、硫化氢的形成、尿酶形成及V.P反应阴性;明胶液化微弱;而硝酸

表2 G₈菌对糖和有机酸的利用

鉴定项目	G ₈ 菌	鉴定项目	G ₈ 菌
葡萄糖	+	醋酸钠	++
半乳糖	+	丙氨酸	+++
果糖	+	谷氨酸	+++
麦芽糖	+	天冬酰胺	++
乳糖	微弱	苹果酸	++
蔗糖	+	延胡索酸	++
可溶性淀粉	-	甘油	+
琥珀酸钠	++	乙醇	++
柠檬酸钠	+	丁酸	++
丁酸钠	++		

注:+表示可利用。

参 考 文 献

- [1] 徐浩, 江慧修, 周惠玲. 微生物学报, 1991, 31(5): 333~337.
- [2] John H. Law and Palph A. Slepecky. J. Bacteriology, 1961, 82:33~36.
- [3] Robert H. Findlay and David C. White. Applied and Enviromental Microbiology, 1983, Jan:71~78.
- [4] 中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法, 北京: 科学出版社, 1978, 149~159.
- [5] 李祖义, 许兴妹. 生物工程学报, 1987, 3(3):212~216.