

几株光合细菌的分离鉴定

柴明 韩静淑 何秀良 段俊英 继尚 芦金星

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

光合细菌是在厌氧条件下利用光能生长发育的菌群, 广泛分布在湖沼、污水、活性污泥及水稻、水葫芦、芦苇、小麦等的根际土中。光合细菌具有净化高浓度有机废水的能力^[1, 2]。据小林达治^[2-4]报道, 光合细菌菌体含有大量的蛋白质、氨基酸、核酸、维生素、类胡萝卜素等, 对植物的生长有促进作用。

本文报道的几株光合细菌是从水稻根际和活性污泥中分离到的, 其生物学特性和分类位置现分述如下。

材料和方法

(一) 菌种来源

光合细菌 L₁ 和 L₆ 菌株是由沈阳市政工程研究所提供的活性污泥中分离得到。光合细菌 L₃ 菌株分离自沈阳市孤家子水稻田的水稻根际处。

(二) 菌种的分离和纯化

1. 培养基: 分离培养基参照文献 [5]。基础培养基 I(mg/L): 71[#] 培养基^[5] 除去乙酸钠、丙酸钠及酵母膏, 加入一定量的生长因子: 维生素 B₁ 1, 生物素 50, 烟酸 1。

2. 菌种的分离与纯化^[5]:

① L₁ 和 L₆ 菌株的分离: 取活性污泥约 15 g 放入 200ml 量筒中, 再加入 71[#] 培养液约 150 ml, 稍加振荡均匀, 液面用灭菌的液蜡封闭, 在自然光照、温度下 (8 月) 培养约半个月。待培养液呈红色, 取此液作一系列稀释度, 分别涂平板 (71[#] 培养基), 置真空干燥器内减压 (约 730 mm 汞柱), 充氮气。在自然光照、温度下培养约 1 个月后, 挑取红色的单个菌落, 镜检菌体运动活跃者。分别移至 71[#] 斜面培养基上, 再移

入液体或半固体试管中, 在厌氧光照条件下 (真空条件同前) 培养, 待色素 (红、红褐、粉红等) 出现后经纯化再移至 71[#] 斜面上 (试管口塞住), 于 28—30℃ 光照条件下培养, 待色素出现后停止培养, 置冰箱保存。

② L₃ 菌株的分离: 取水稻根际土 (包括稻根) 约 30g, 置 250ml 三角瓶中, 加入 71[#] 培养液约 200ml, 培养过程同前。

(三) 形态观察及生理特性的测定

测定方法主要参照文献 [5, 6]。

(四) 碳源的利用

在培养 48 小时的 L₁、L₃ 和 L₆ 菌株的斜面中, 分别加入无菌水洗涤菌体制成菌悬液, 离心洗涤 3 次, 最后制成休止细胞悬液, 用生长谱法, 在不同碳源平板 (基础培养基 I 分别加入 0.2% 的不同碳源) 上点涂菌液, 于 28℃ 培养 48 小时观察结果。

(五) DNA 萃取

主要按 Marmur 氏法^[7] 萃取核酸。

(六) 最适 pH 测定

配制 71[#] 培养液, 用氢氧化钠和硫酸调成一系列不同 pH 值, 灭菌后分装于试管中, 接种 L₁、L₃ 和 L₆ 菌株后于 28—30℃ 培养 15 天, 观察结果。

结果和讨论

(一) 形态和培养特征 (见图 1)

1. 菌体形态: L₁ 和 L₆ 菌株均为似球形短杆菌, 具极生丛毛。L₃ 菌株为杆菌, 具极生单毛。三株菌菌落圆凸形, 表面湿润光滑, 边缘整齐。在 71[#] 培养基上好气暗条件下培养 48 小时, 菌细胞无色素生成。在厌氧光照条件下培

表 1 三株菌对碳源的利用情况

菌生长		菌株				
碳 源		L ₁	L ₃	L ₆	<i>R. acidophila</i> ^[9]	<i>R. spheroides</i> ^[9]
硫代硫酸钠		—	—	—	—	—
乙 酸 钠		+++	+++	+++	+	+
丙 酸 钠		+++	干	+++	+	±
丁 酸 钠		+++	干	+++	+	±
乳 酸 钠		+++	+++	+++	+	+
苹果酸钠		+++	+++	+++	+	+
酒石酸钠		—	++	—	±	+
琥珀酸钠		干	干	干	+	+
柠檬酸钠		+++	++	+++	+	+
戊二酸钠		+++	+	+++		
丙酮酸钠		干	干	干	+	+
丙氨酸钠		+++	++	++		
门冬氨酸钠		+++	+++	+++	—	0
门冬酰胺		+++	+++	干		
亮氨酸钠		+++	++	+++		
谷氨酸钠		+++	++	+++	—	0
精氨酸钠		—	++	干	—	0
苯甲酸钠		+	干	干	—	—
葡萄糖		—	+++	—	±	+
果 糖		干	++	—	—	+
甘露醇		—	+++	—	—	+
山梨醇		—	++	—		
乙 醇		+++	+++	+++	+	+
甘 油		—	++	干	±	+
蛋白胨		—	++	干	±	+

注：“+”生长一般，“++”生长较好，“+++”生长最好，“干”不生长或长时间培养略有生长，“—”不生长，“±”某些菌生长，“0”未试验。

表 2 三菌株在不同 pH 培养液中的生长情况

菌 株	L ₁		L ₃		L ₆	
	菌生长		菌生长		菌生长	
	pH (培养后)	生 长	pH (培养后)	生 长	pH (培养后)	生 长
pH(培养前)						
3.0	3.3	干	3.0	—	3.1	—
3.6	3.6	+	3.6	—	3.5	—
4.0	3.9	+	4.0	—	3.9	—
4.6	4.6	+	4.6	—	4.5	—
5.0	5.0	+	4.8	—	4.8	+
5.6	5.5	+++	7.6	+	5.5	+++
6.0	5.7	+++	8.2	+++	5.5	+++
6.6	5.7	+++	7.9	++	5.7	+++
7.0	5.9	+++	8.1	+	5.7	+++
7.6	5.8	+++	8.1	+	5.7	+++
8.0	5.7	++	5.3	+	9.0	++

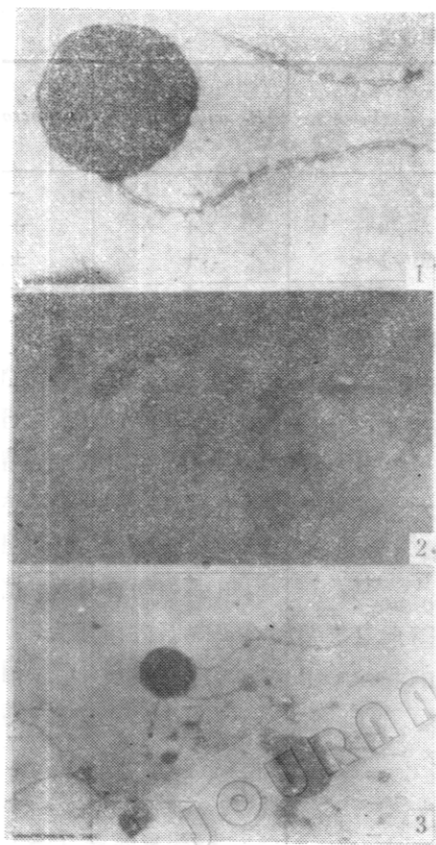


图1 光合细菌的形态特征

1. L_1 株 ($\times 26000$) 2. L_3 株 ($\times 3800$)
3. L_6 株 ($\times 6000$)

养,菌细胞合成色素呈现红色或粉红色。

2. 生理特征: 三株菌均为革兰氏染色阴性,接触酶阳性, H_2S 生成、吡嗪生成、硝酸盐还原、明胶液化均为阴性,对淀粉的水解, L_3 阳性, L_1 和 L_6 均为阴性。

(二) 碳源的利用(见表1)

光合细菌对碳源的利用范围因种而异,是种的分类依据之一^[8]。表1指出, L_3 菌株对甘油、山梨醇、甘露醇和酒石酸钠具有明显的利用

性,这一点与球形红假单胞菌 (*R. sphaeroides*) 相一致。 L_1 和 L_6 菌株对碳源的利用性和嗜酸红假单胞菌 (*R. acidophila*) 基本相符。

(三) DNA 中的 G + C 克分子 % 的测定

L_1 和 L_6 菌株的 G + C 克分子 % 分别为 61.9 和 62.7, 此结果与文献[9]相符。

(四) 最适 pH (见表2)

表2指出, L_1 菌株在培养液 pH3.6 时能生长,在 pH5.6—7.6 时生长良好,并具有较强的嗜酸性。 L_6 菌株在培养液 pH5.0 时能生长,在 pH5.6—7.6 时生长良好,也具有一定的嗜酸性。 L_3 菌株的最适生长 pH 在 6.0—6.6 之间。

根据上述试验结果,说明三株菌均属红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*), L_1 和 L_6 为嗜酸红假单胞菌 (*R. acidophila*), L_3 为球形红假单胞菌 (*R. sphaeroides*)。

参 考 文 献

- [1] 小林達治: 日本土壤肥科学雑誌, 46 (3): 101—109, 1978。
- [2] 小林達治: 日本土壤肥科学雑誌, 46 (4): 148—156, 1978。
- [3] Kobayashi, M. and Kurata, S.: *Process Biochemistry*, 13:27—30, 1978。
- [4] 小林達治: 発酵工工業, 36(7): 574—583, 1978。
- [5] 土壤微生物学会编: 土壤微生物实验法, 207—212; 434, 養賢堂, 东京, 1975。
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978。
- [7] Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962。
- [8] 星野八洲雄: 発酵工工業, 36(7): 552—562, 1978。
- [9] Roderick, R. and William, R. Sitron: "The Photosynthetic Bacteria" Plenum Press, New York, pp. 20, 1978。