

几株光合细菌的分离鉴定及在养殖罗非鱼中的应用*

黄志勇^{1,3} 王海胜² 蒋培霞² 宋安东² 刘志培^{1**}

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)¹

(河南农业大学生物技术与食品科学学院 郑州 450002)²

(Savannah River Ecology Lab, University of Georgia, 227 Gateway Dr., SC 29802)³

摘要:从渔场底泥样品中分离纯化得到 5 株紫色非硫光合细菌, 根据分离菌株的细胞形态结构、光合内膜结构、活细胞光吸收特征以及生理生化特征, 参照伯杰氏细菌分类学手册, 5 个分离株分别属于沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 和类球红细菌 (*Rhodobacter spheroides*)。利用它们的纯培养物及混合培养物进行的水产养殖试验表明, 光合细菌可以明显提高养殖鱼的成活率以及生长速度, 罗非鱼经过 2 周的养殖后, 加入光合细菌的试验组比没加入光合细菌的对照组 (成活率 80%) 成活率显著提高, 最高达 100%; 平均体长、体重分别提高了 3% ~ 5%、20% ~ 30%, 效果显著; 而同时加入光合细菌纯培养物的试验组和加入混合培养物的试验组, 差别不大。

关键词:光合细菌, 分离, 鉴定, 水产养殖

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0072-07

Isolation and Identification of Several Photosynthesis Bacteria and Their Application in the Culture of *Tilapia* sp. *

HUANG Zhi-Yong^{1,3} WANG Hai-Sheng² JIANG Pei-Sia² SONG An-Dong² LIU Zhi-Pei^{1**}

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)¹

(College of Biology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)²

(Savannah River Ecology Lab, University of Georgia, 227 Gateway Dr., SC 29802, USA)³

Abstract: Five purple non-sulfur bacterial strains were isolated from the sediments of the rearing pond. According to the cultural, morphological, cellular spectra, physiological properties and inner intracytoplasmic membrane structures, strain AS-31 that was short rod and contained lamellar intracytoplasmic membrane was identified as *Rhodopseudomonas palustris*, and other four isolates (AS-32, DA-32, SY-32, and SY34) which were spheroid and contained vesicular intracytoplasmic membranes were identified as *Rhodobacter spheroides*. Pure cultures of strains AS-31 and SY-32 were used as additive in aquaculture of *Tilapia* sp.. After weeks of incubation, the weight and surviving percentage of experimental fishes increased about 20% than those of the control group without any additive. However, the mixed culture of strains AS-31 and SY32 have no obvious effect than that of the pure one. It demonstrated that the cultures of purple non-sulfur bacteria are of benefit to aquaculture and could be used as an additive.

Key words: Photosynthesis bacteria, Isolation, Identification, Culture of *Tilapia* sp.

光合细菌 (Photosynthetic bacteria, 简称 PSB) 是一类能进行不放氧光合成作用的细菌总称。具有固定二氧化碳、净化有机污染、固氮、硫化、厌氧生物脱氮等的不同

* 海洋“863”项目资助 (No. 2001AA621040)

** 通讯作者 Tel: 010-62653757, E-mail: liuzhp@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-10-13, 修回日期: 2004-11-22

生理功能,在地球生物圈中 C、N、S、P、O 等生命元素的循环和能量转化中起重要作用。此外,光合细菌在生命演化过程中也处于非常重要的地位。在生命三界说中,光合细菌的几个类群作为生物进化的节点均出现在系统分类树上,他们是生命演化中的过渡类型^[1]。近年来,随着分子生物学技术的发展和基因组计划的进行,两株紫色非硫细菌:沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palusteris*)和类球红细菌(*Rhodobacter spheroides*)的全基因序列图谱已经全部完成。它将从根本上加强人们对光合细菌独特的生理生化特性,多种多样的代谢类型以及基因调控机理的深入了解和认识。

光合细菌不仅作为生物材料在遗传和进化研究等方面有重要意义,它还具有非常广阔的应用前景。光合细菌能够在自然界高浓度有机污水中大量繁殖,在污水自净过程发挥着不可替代的作用^[2]。随着石油危机的临近,以光合细菌产氢^[3]为代表的洁净的可再生生物能源有潜在的市场价值。而且,光合细菌在其它应用方面,如降解芳香族化合物^[4],养殖业^[5]、废水处理^[6]、航天器载人飞行^[7]、食品添加剂^[8]等方面,都取得良好效果。

光合细菌的细胞营养丰富,蛋白质含量高达 60%,并富含 B 族维生素和辅酶 Q、叶酸、生物素、微量元素、细菌叶绿素 a,细菌叶绿素 b、类胡萝卜素等多种生理活性物质^[9]。这些活性物质以及细胞分泌物和代谢产物能促进动植物对养分的吸收,抑制某些有害微生物的生长繁殖,减少环境中氨态氮、硝态氮的积累,增加溶解氧,改善水质。

本实验从养鱼场底泥样品中分离纯化到 5 个光合细菌菌株,对其从细胞形态、孢囊形态、光合作用内膜、光吸收特征图谱、生理生化等方面进行分类鉴定,以这些分离株的纯菌株及混合菌株的培养物作为添加剂进行水产养殖试验,结果表明其效果显著。

1 材料与方法

1.1 样品来源

渔场底泥样品分别由中国农业科学院,沈阳丰源生物技术有限公司,农业部提供。罗非鱼,购于朝阳渔场,共分 4 组进行实验,每组 15 条,平均体重 175g,体长 21.5cm。饵料购于北京友谊饲料公司。

1.2 培养基

基础培养基(ATYP):乙酸钠 1g,琥珀酸钠 1g,酵母粉 1g,蛋白胨 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, NH_4Cl 1g, MgCl_2 0.2g, NaCl 0.1g, CaCl_2 0.08g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.012g, EDTA-Na 0.1g, 维生素 1 mL, 微量元素 1 mL, 水定容至 1,000 mL, pH 7.0, 0.55×10^5 Pa 灭菌 30 min。

微量元素: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,800 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 70 mg, ZnCl_2 100 mg, H_3BO_3 500 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, 定容至 1 L。

维生素:生物素 10 mg, 烟酸 35 mg, 盐酸硫胺素 30 mg, 对氨基苯甲酸 2 mg, 盐酸吡哆胺 10 mg, 泛酸钙 10 mg, Vitamin B_{12} 5 mg, 定容至 1 L。

孢囊培养基(ATB):以丁酸钠为唯一碳源的基础培养基,用于观察孢囊的生长及形态。

1.3 菌种分离和纯化——软琼脂深层逐级稀释法

将 1 g 底泥样品溶在 100 mL 无菌水中,于 500 r/min 摇床培养 30 min。取 1 mL 进

行 10 倍系列稀释, 每个稀释度各取 1 mL 加入小试管中, 然后加入 20 mL 溶化后冷却至 45℃ 的 0.7% 琼脂的基础培养基。密闭后于 30℃, 光照培养 7d。

将稀释管中长好的单菌落挑出, 在 ATYP 液体培养基中培养 7d, 再重复软琼脂深层逐级稀释法, 反复纯化 2~3 次, 直到培养基中没有其它杂菌菌落出现, 并通过光学显微镜观察直到获得纯菌株为止。

1.4 培养条件

厌氧光照培养, 30℃~35℃, 1,000~2,000 Lux 光照, 培养 3~5d。黑暗好氧培养, 黑暗条件下, 150 r/min 摇床, 30℃ 培养 5~7d。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 培养特征及个体形态: 光学显微镜与扫描电子显微镜观察个体形态及大小。透射电镜观察细胞切片的光合内膜及孢囊。

1.5.2 细胞色素的吸收光谱: 活细胞吸收光谱的测定用 HEWLETT PACKARD 1047A 和 HITACHI 扫描 300 nm~820 nm 波长范围的吸收光谱。

1.5.3 生理生化试验: 菌株的生理生化特性鉴定参照文献 [10] 所述方法进行。

1.6 水产养殖试验

试验在 150 cm × 130 cm × 120 cm, 水深 100 cm 的鱼池中进行, 分 4 组, 每组 15 尾, 其中 1# 池仅投加饵料和灭菌后的 ATYP 培养基 100 mL 作为对照池 (CK), 2# 池在投加饵料的同时投加 100 mL 分离菌株 SY-32, 3# 池同时投加饵料和 100 mL 分离菌株 AS-31, 4# 池投加饵料同时加光合细菌 SY-32、AS-31 的培养液各 50 mL。试验前后所有实验鱼逐尾测定其体长和体重, 试验期间每 7 d 测 1 次体长体重, 每次测定前停食 12 h (即早上喂食前测定)。在整个养殖试验中, 每 3 d 换水 1 次, 每天充氧 4 h。每天上午 9:00~10:00, 下午 4:00~5:00 各投加饵料 1 次, 日投量为鱼体重的 2%~3%, 以投喂后 15~30 min 吃完为度 (可视情况而定), 光合细菌培养物的添加量为鱼体重的 5%, 以拌料方式进行。

2 实验结果

2.1 菌株分离

利用软琼脂深层逐级稀释法, 从样品中分离、纯化到 5 株光合细菌, 分别命名为 AS-31、AS-32、DA-32、SY-32、SY-34。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 培养特征和活细胞光吸收特征: 分离到的 5 株均为光合细菌, 表 1 的培养特征表明他们均为紫色非硫细菌, 可以分为两种, 菌株 AS-31 为一种, 菌株 AS-32、DA-32、SY-32 和 SY-34 属另一种。选择其中的 AS-31、SY-32 进行活细胞吸收光谱扫描。图 1 的结果表明, 这两株菌均含有细菌叶绿素 a (375~382, 585~596, 798~806 nm 处的吸收峰) 及类胡萝卜素 (448~454, 480, 508~512 nm 处的吸收峰), 活细胞的光吸收特征进一步表明了他们属于紫色非硫细菌。此外, 表 1 还表明, 菌株 AS-31 具有红色培养物、黑暗好氧不能生长以及耐盐低于 3% NaCl 的红假单胞菌属的特征; 而其余 4 个菌株具有棕色培养物、能够进行黑暗好氧生长且培养物为棕色至粉红色、3% NaCl 及淡

水中都能生长的典型特征^[11]。

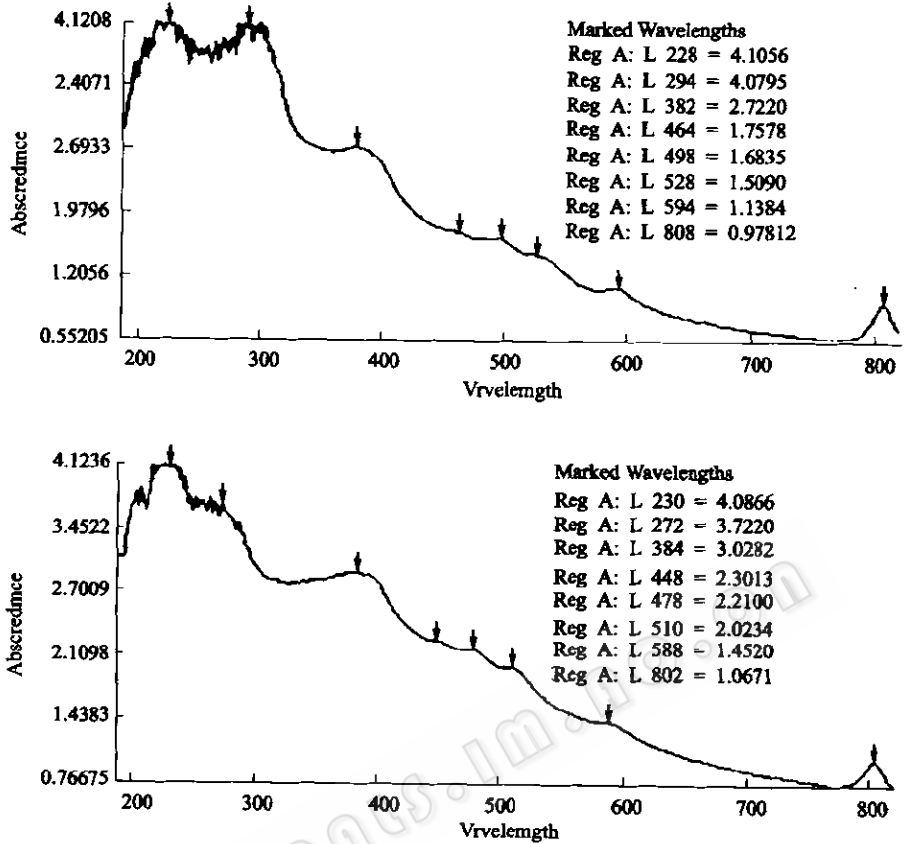


图1 菌株 AS-31 和 SY-32 活细胞的光吸收图谱
A 为菌株 AS-31, B 为菌株 SY-32

表1 分离菌株的主要培养特征

菌号	AS-31	AS-32	DA-32	SY-32	SY-34
培养物颜色	红色	棕色	棕色	棕色	棕色
黑暗好氧生长	-	+	+	+	+
黑暗好氧培养物颜色	-	粉红色	浅黄	棕色	棕色
最适温度 (℃)	25 ~ 35	28 ~ 35	28 ~ 33	25 ~ 35	25 ~ 33
最适 pH	6.0 ~ 8.0	6.5 ~ 7.5	6.5 ~ 8.0	6.0 ~ 7.5	6.5 ~ 7.5
耐盐性 (3% NaCl)	-	+	+	+	+
细菌叶绿素 a	+	+	+	+	+
细菌叶绿素 b	-	-	-	-	-
rhodopinal series	+	-	-	-	-
spheroidene series	-	+	-	+	+
Spirilloxanthin	-	-	-	-	-
Lycopene 1, 2-dihydrolycopen	-	-	-	-	-

2.2.2 形态结构特征：分离到的 5 株光合细菌为杆状或卵球状，大小均在 1 μm 左右，能运动，具有光合内膜，革兰氏阴性。结果详见图 2 和表 2。

表 2 分离菌株的形态特征和结构特征

菌株	AS-31	AS-32	DA-32	SY-32	SY-34
形成玫瑰结菌落	+	-	-	-	-
有特殊生活史	++	-	-	-	-
菌体大小 (μm)	0.4~0.6 × 1.2~3.6	0.7~9.0 × 0.6~0.9	0.8~1.0 × 0.7~0.9	0.8~1.0 × 0.6~1.2	0.9~1.3 × 0.7~1.2
菌体形态	杆状	卵球状	卵球状	卵球状	卵球状
荚膜	-	+	+	+	+
鞭毛	极生	周生	周生	周生	周生
细胞分裂	出芽分裂	二分裂	二分裂	二分裂	二分裂
分裂管	+	-	-	-	-
光合内膜	片层状	泡囊状	泡囊状	泡囊状	泡囊状

* 可形成丝状体和孢子

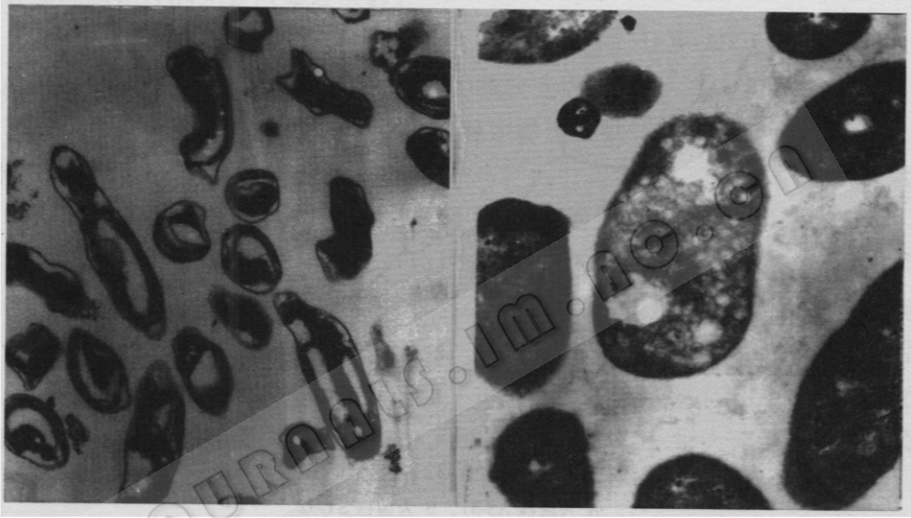


图 2 分离菌株的光合内膜结构 (40,000 ×)

A 菌株 AS-31 光合内膜呈片层状, B 菌株 SY-32 光合内膜呈泡囊状

表 2 和图 2 的结果表明, 菌株 AS-31 具有可以形成玫瑰结的菌落、可以形成丝状体和孢子的特殊生活史、细胞杆状、无荚膜、极生鞭毛、细胞以形成分裂管的出芽方式分裂、片层状结构的光合内膜等沼泽红假单胞菌的典型特征^[11]; 而菌株 AS-32、DA-32、SY-32 和 SY-34 具有不形成玫瑰结菌落、无特殊生活史、细胞卵球形、有荚膜、周生鞭毛、以二分裂方式繁殖、泡囊状结构的光合内膜等类球红细菌的典型特征^[10]。

2.2.3 生理生化特征: 5 个分离株的生理生化特征列于表 3。表 3 的结果表明, 5 个分离菌株均可以利用小分子的有机酸生长, 也能利用部分氨基酸和醇类化合物进行生长。表 3 的结果表明, 菌株 AS-31 的生理生化特征与沼泽红假单胞菌基本一致; 菌株 SY-32 及相似菌株与类球红细菌也基本一致^[10]。

表 3 分离菌株的生理生化特征

碳源	AS-31	AS-32	DA-32	SY-32	SY-34
甲酸钠	+	+	+	+/-	+
乙酸钠	+	++	+	+	+
丙酮酸	+	++	+/-	+	+

续表 3

延胡索酸钠	+	++	+	+/-	+
乳酸钠	+	+	+	+	+/-
琥珀酸钠	+	+	+	+	+
柠檬酸钠	+	++	++	+/-	+
酒石酸钠	-	+	+	+	+
葡萄糖酸钠	-	-	+ -	+	+/-
苯甲酸钠	+	+	- +	+/-	
谷氨酸钠	-	+	+	+	+
精氨酸钠	-	-	+	-	+
乙醇	+/-	+	+	+/-	+/-
丙三醇	-	+	+	+	+

注：+ 利用，- 不利用，++ 利用很好，+/- 利用不好

2.2.4 鉴定结果：根据上述结果，参照文献 [10]，根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 1974) 第八版，和《伯杰氏系统细菌手册》(Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 1984)，将分离菌株株鉴定为：AS-31 菌株为沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palusteris*) 和 SY-32 及相似菌株为类球红细菌 (*Rhodobacter spheroides*)。

2.3 光合细菌在罗非鱼养殖中的应用效果

以分离菌株沼泽红假单胞菌 AS-31 和类球红细菌 SY-32 为代表研究光合细菌的纯培养物在水产养殖中的应用价值。将两株光合细菌分别扩大培养，每次投加 100 mL 到饵料中，而对照池仅投加 100 mL 灭菌的 ATYP。养殖 2 周后测定罗非鱼的生长指标，结果如表 4 所示。1#池为对照池，2#池投加的饵料中混合有 100 mL 沼泽红假单胞菌 AS-31 的纯培养液，3#池中投加拌有 100 mL 类球红细菌 SY-32 纯培养液的饵料，4#池中则投加拌有 50 mL 沼泽红假单胞菌 AS-31 和 50 mL 类球红细菌 SY-32 的纯培养液的饵料。与 1#对照池相比，所有投加伴有光合细菌饵料的试验池中的罗非鱼的成活率均为 100%，明显高于对照池的 80.0%。此外，喂养加有光合细菌饵料的实验组，比对照组在体长和体重的增加更为明显，1#池对照组的平均体长增长率为 2.75%、体重增长率为 22.55%；而实验组 2#池中罗非鱼的平均体长增长率为 4.27%、体重增长率为 29.55%，3#池的平均体长增长率 3.72%、体重增长率为 26.53%，4#池的平均体长增长率 3.64%、体重增长率为 27.36%，都明显高于对照组。但实验组各池之间差异不是很明显，仅 2#池中的罗非鱼平均体重增长 53.32g，增长了 29.55%，在所有试验池中增幅最为显著。

表 4 各池中罗非鱼生长指标比较

编号	饵料	放养时		两周后		活率 (%)	体长增 长率 (%)	体重增 长率 (%)
		平均体长 (cm)	平均体重 (g)	平均体长 (cm)	平均体重 (g)			
1#	饲料	21.8 ± 5.69	200.0 ± 31.31	22.4 ± 14.24	245.1 ± 43.52	80.0	2.75	22.55
2#	饲料 + AS-31	21.1 ± 7.42	180.0 ± 42.13	22.6 ± 16.49	233.2 ± 57.18	100	4.27	29.55
3#	饲料 + SY-32	21.5 ± 12.21	190.7 ± 39.03	22.3 ± 18.15	241.3 ± 52.15	100	3.72	26.53
4#	饲料 + (AS-31 + SY-32)	22.0 ± 8.95	204.3 ± 44.6	22.8 ± 21.47	259.2 ± 61.32	100	3.64	27.36

3 讨论

从样品中共分离纯化到 5 株紫色非硫细菌, 对分离菌株的形态结构、生理生化等方面进行分类鉴定。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974) 第八版, 和《伯杰氏系统细菌手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984), 中描述的形态及生理生化特征进行鉴定, 并参照科学出版社出版的《细菌名称》, 其中菌株 AS-31 为沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*), 菌株 AS-32, DA-32, SY-32 和 SY-34 为类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)。

实验表明, 在饵料中添加适量的光合细菌, 能提高水产养殖效果。实验中罗非鱼的成活率提高到 100%, 体重增长率提高了约 5 个百分点 (由 22.55% 提高到 26.53 ~ 29.55%), 说明纯的光合细菌不仅能提高渔业养殖中养殖产品的成活率, 而且还具有一定的促生长作用, 与李勤生等人^[11]的结果一致。由此也进一步说明, 日前国内市场上的光合细菌菌剂的活性其实主要由紫色非硫细菌在起作用。同时, 纯培养的沼泽红假单胞菌和类球红细菌在 2# 与 3# 池结果的对比中有一定差异, 说明不同种的紫色非硫细菌对水产养殖效果略有不同, 而纯种与混合光合细菌对养殖效果差别并不明显。

水产养殖过程中, 水的质量是控制养殖密度和产量的重要因素。紫色非硫细菌为一种古老的细菌, 细胞内同时存在多种代谢途径, 能分解小分子有机物, 转化水中氨氮, 参与硫的代谢等等, 因此在水质净化等方面的具有重要作用。正因为如此, 随着菌剂的投加, 鱼池水环境中的菌群结构发生变化, 紫色非硫细菌成为主流菌 (dominant bacteria), 在其作用下, 剩余的饵料被及时分解, 而由鱼产生的氨氮浓度会被降低到比较低的水平, 使水质得到净化。光合细菌本身就是一种活性蛋白, 蛋白质占细胞干重的 60%, 菌体中同时富含 B 族维生素和辅酶 Q、叶酸、生物素、微量元素等多种活性物质^[9], 可以促进养殖品种的生长速度、提高其抗病能力, 从而提高养殖效益。

参考文献

- [1] Trüper H G, Dworkin M, Harder M. The Prokaryotes 2nd ed. Heidelberg: Springer-verlag, 1992, 1: 2145 ~ 2155.
- [2] 杜近义, 秦际威. 生物学通报, 1998, 33 (11): 16 ~ 18.
- [3] 杨素萍, 曲音波. 现代化工, 2003, 23 (9): 17 ~ 22.
- [4] 黄志勇, 杨惠芳, 刘双江. 环境科学学报, 1999, 19 (3): 307 ~ 312.
- [5] 魏丽娟, 苑七星. 中国水产, 1998, 11: 25 ~ 25.
- [6] 宋志文, 郭本华. 水处理信息报导, 2004, (1): 61 ~ 62.
- [7] 杨惠芳, 黄志勇, 张德民, 等. Space Medicine & Medical Engineering, 1999, 12 (1): 46 ~ 50.
- [8] 杨丽飞, 邓宇. 中国食品添加剂, 2003 (6): 93 ~ 95.
- [9] 王绍校, 杨惠芳, 黄志勇, 等. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (3): 298 ~ 301.
- [10] 东秀珠, 彩妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 李勤生. 水利渔业, 1995, (1): 4 ~ 5.