

采用 Hungate 厌氧培养技术分离纯化光合细菌

于温旭 钱新民 王宇新

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

摘要 利用 Hungate 厌氧培养技术, 克服传统分离光合细菌方法的不足, 是一种快速、准确、简便地分离纯化光合细菌的方法。

关键词 厌氧培养技术; 光合细菌; 纯化

目前, 分离纯化光合细菌的方法甚多, 但常用的几种方法存在着一些缺点: Van Niel 创立的“搅动”琼脂法^[1], 在操作过程中琼脂培养基很快凝固, 给稀释带来困难; Контрабева 分离纯化法^[2]易产生气泡, 挑取单菌落时容易污染; 厌氧光照平板法^[3]较繁琐, 且易使琼脂脱落或培养时间较长而造成琼脂干缩。为了改进光合细菌的分离纯化方法, 我们借助 Hungate 厌氧培养技术^[4]收到了较好的效果, 现将有关实验方法和结果介绍如下。

材料与 方法

(一) 材料 Hungate 厌氧培养装置 (图 1)。

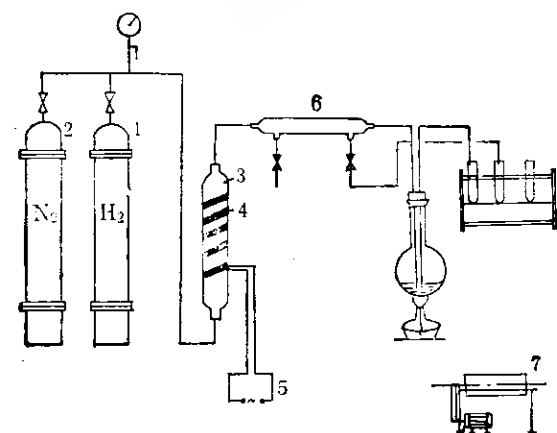


图 1 Hungate 厌氧培养装置示意图

① 氢气钢瓶 ② 氮气钢瓶 ③ 石英玻管(或耐高温普通玻璃管) 35×350mm 两端收缩为 8×50mm, 内装 3/4 体积的铜屑 ④ 石棉加热带 ⑤ 变压器控制加热带温度 ⑥ 带有多个出气橡胶管的多孔玻管 ⑦ 滚管机

除上述装置外还需注射器、毛细管(粗的一端塞有棉花, 细的一端弯成 90°)、带异丁烯橡皮塞和中间有小孔耐高压塑料螺旋盖的厌氧管。

(二) 方法与步骤

1. 高浓度无氧气体的制备: 接通电源, 变压器输出电压 90—100V, 电压从零逐渐上升到 100V, 加热铜屑柱 20—30 分钟, 打开氮气总阀, 调节分压阀, 得到平稳的氮气气流。若铜屑已被氧化成黑色则接氢气进行还原至出现纯铜铮亮色时换上氮气流使用。

2. 无氧培养基的制备: 固体培养基(%) : MgSO_4 0.05g, KH_2PO_4 0.05g, 蛋白胨 0.1g, 糊精 0.5g, 琼脂 1.8g, FeSO_4 微量。若样品取自海水则加 3% 的 NaCl 。

在圆底烧瓶中加入不超过烧瓶体积 2/3 的固体培养基, 再加入 0.1% 的刃天青溶液 0.2%。标好刻度后加入培养基体积 20% 的蒸馏水。加热沸腾, 通入无氧氮气。根据所欲分离不同的光合细菌(红螺菌科 pH 7.0; 着色菌科 pH 8.0—8.5; 绿硫菌科 pH 7.3) 用 10% 的 Na_2CO_3 和 0.1N H_3PO_4 调 pH。待刃天青指示剂还原为无色时, 分装到厌氧管中。

分装时先往空管中通无氧氮气 1—2 分钟后, 用注射器取 4.5ml 培养基迅速移入厌氧管中, 继续通氮气, 刃天青指示剂保持无色。在抽针的同时塞紧异丁烯胶塞, 螺旋盖拧紧。湿热灭菌 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 20—30 分钟。

3. 光合细菌的分离及纯化

(1) 光合细菌的分离: 将溶化好的装有固体培养基的厌氧管置于 45—50℃ 水浴中。分离着色菌科细菌时先注入 1.5% 的过滤除菌无氧 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.15ml, 然后取 0.1ml 稀释至 10^{-5} — 10^{-6} 的富集液用注射器注入, 轻摇, 平放于滚管机的滚轴与支托点之间, 启动滚管机, 使厌氧管匀速转动。由于滚轴带动水的冷却作用, 培养基在厌氧管壁上形成均匀透明的薄膜。

置 1000—2000Lx, 28℃ 培养 3—4 天可长出单菌落。

(2) 菌落的转移和纯化: 由于光合细菌含有特殊的色素, 因此易于辨认。

将两个氮气流针头在酒精灯上灭菌, 打开欲取出菌落的厌氧管塞和装有液体培养基^[1]的厌氧管塞的同时插入液体培养基。28℃, 2000 Lx 培养至液体管出现光合细菌特有的颜色。

镜检, 看液体管中菌的形态是否单一, 否则重复以上过程继续分离。

结果与讨论

1. 该方法操作简便、迅速, 适于光照, 分离效率高, 菌落易于辨认, 易挑取, 操作过程不易污染等优点(图 2)。

2. 该方法的整个操作过程都在无氧状态下, 满足严格厌氧的绿硫菌科、着色菌科的要求, 克服了以往分离方法中以单一常见菌种为主的现象。

3. 培养基中加入刃天青, 当氧化还原电位较高时为紫色或粉红色(视 pH 而定), 氧化还原电位低于 -42mV 时则为无色, 颜色变化明显且对菌的生长没有影响, 可以直观地判断是



图 2 滚管法分离的光合细菌

否处于无氧状态。

4. 在培养基中加入 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 不仅可以进一步降低氧化还原电位, 同时也是光合细菌的光合电子供体。液体培养着色菌科和绿硫菌科的细菌, 开始培养基无色, 随着生长 S^{2-} 被利用, 变成粉红色, 这时要补充 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液。

5. 以上是分离纯化一般光合细菌普遍适用的方法, 可根据欲分离菌的特点简化上述方法。

参考文献

1. Van Niel C B: *Arch. Microbiol.*, 3: 1, 1931.
2. Конряובהва, Е.Н.: Фотосинтезирующие Вактерии, ИЗД-ВО, Ансср Москва. 1963.
3. [日]土壤微生物研究会编: 土壤微生物实验法, p. 306, 东京株式会社养贤堂, 1975 年。
4. Hungate R E: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, Vol. 3B, Academic Press Inc., New York. pp. 117—132, 1969.
5. 郑士民等: 自养微生物, 科学出版社, 北京, p. 80—107 1983.