

测定极端嗜盐古菌保持完整细胞形态最低 NaCl 浓度研究方法探析

陈绍兴^{1*} 梁 敏¹ 费宗伟¹ 谢志雄^{2*}

(1. 红河学院生命科学与技术学院 蒙自 661100)

(2. 武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘 要: 细菌要维持其完整的细胞形态需要一定的渗透压, 根据极端环境微生物耐盐程度的差异大致分为非嗜盐、弱嗜盐、中等嗜盐、极端嗜盐和耐盐菌 5 大类。本研究组通过测定不同浓度 NaCl 条件处理下, 600 nm 处的光谱吸收的改变值结合显微照相的方法, 对极端嗜盐古菌维持完整细胞形态所必须的最低 NaCl 浓度进行研究, 发现极端嗜盐古菌 CY1 保持完整的细胞形态的最低 NaCl 浓度为 8%~10%。并建立了较为系统、可靠的测定极端嗜盐古菌保持完整细胞形态最低 NaCl 浓度的研究方法。

关键词: 极端嗜盐古菌, 耐盐程度, 细胞形态

Methods on Detecting the Minimum NaCl Concentration Which Could Maintain the Integrity Cell Morphology from Extremely Halophilic Archaea

CHEN Shao-Xing^{1*} LIANG Min¹ FEI Zong-Wei¹ XIE Zhi-Xiong^{2*}

(1. College of Life Sciences, Honghe University, Mengzi 661100)

(2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: Bacteria had to been in a certain degree of osmolality to maintenance intact cell figure. This study carried on the research on lowest concentration of NaCl which to keep complete cells figure of extremely halophilic archaea strain CY1. The research methods were measuring the change of optical density at 600 nm by dealing with different concentration of NaCl. Microscope figures were taken after a simple staining. The lowest concentration of NaCl was 8% ~10%.

Keywords: Extremely halophilic archaea, Salt tolerance, Cell morphology

嗜盐菌是指在高盐浓度条件下生长的细菌^[1]。其在盐浓度 15%~30%的介质中能良好生长, 最适生长盐浓度为 20%~25%, 在饱和盐浓度中仍能

生长^[2]。极端嗜盐古菌生活于盐湖, 盐田及盐腌制品的表面, 当盐浓度低于 10%时则不能正常生长^[3]。

Na⁺对维持其细胞壁结构和功能有极为重要的

作用^[4]。极端嗜盐古菌细胞壁成分较特殊,以脂蛋白为主,其结构的完整由离子键维持^[4],高 Na^+ 浓度使蛋白质亚单位的结合,维持了细胞壁的完整,低 Na^+ 浓度使细胞壁蛋白质解聚为蛋白质单体,而不能保持细胞壁的完整;另一方面胞内外离子平衡打破,细胞吸水膨胀,引起细胞破裂^[5]。目前报道的关于测定极端嗜盐古菌保持完整细胞形态的方法有:2005年徐晓红^[6]的 OD_{460} 测定法,2003年李卫^[7] OD_{460} 和 OD_{540} 测定法。本实验组用 OD_{600} 法并结合显微照相等方法来对极端嗜盐古菌保持完整细胞形态最低NaCl浓度进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌种的来源

采集于云南省楚雄一平浪盐矿,由本研究小组分离纯化,并经初步生理生化,菌落形态、颜色鉴定,为极端嗜盐古菌(暂时命名为CY1,结果未发表)。

1.2 培养基的制作

嗜盐液体培养基的配方,见文献[8]。

嗜盐固体培养基的配方:同上,另外添加2%的琼脂粉, 1×10^5 Pa, 15 min; 温度降到 65 ~70 时,倒平板, 50 mL/皿($\phi=90$ mm), 弃掉不溶物。

1.3 极端嗜盐古菌 CY1 完整的细胞形态的检测方法

1.3.1 ΔOD_{600} 法^[9]:取等量活化后的菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管内, 10000 r/min, 3 min, 弃上清液, 分别加入浓度为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%的NaCl溶液 1 mL, 充分混匀 5 min, 分别测定 OD_{600} 值。测定各个NaCl浓度(W/V)条件处理的菌悬液的 OD_{600} 值与原菌悬液的 OD_{600} 值,并求出原菌悬液的 OD_{600} 值与NaCl浓度(W/V)条件处理的菌悬液的 OD_{600} 值的差值。

1.3.2 显微观察^[10]:不同浓度NaCl溶液的配制:分别配制 0% (蒸馏水); 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%和 18%的NaCl溶液处理, 简单染色观察。

2 结果与讨论

2.1 ΔOD_{600} 法

当光线通过菌体细胞悬浮液时,由于菌体细胞的散射及吸收作用使光线的透过度降低,在一定范围内,细胞浓度与透光度成反比^[8],即悬浮液中细

胞浓度增大 OD 值相应变大。完整的极端嗜盐古菌菌体细胞在 600 nm 波长处有最大的吸收峰。如图 1 所示,该图所示原菌悬液的 OD_{600} 与NaCl浓度条件处理后的 OD_{600} 的差值,即 ΔOD_{600} 。 ΔOD_{600} 的大小反映,原菌悬液中极端嗜盐古菌细胞浓度与NaCl浓度条件处理后细胞浓度的差值,亦反映极端嗜盐古菌菌体细胞裂解的情况。 OD_{600} 大,说明极端嗜盐古菌细胞裂解的数量多。反之亦然。

如图 1 所示,从左至右(NaCl浓度由 0 %至 20%), OD_{600} 呈下降的总趋势,该趋势说明随NaCl浓度的升高,不同浓度NaCl 条件处理中极端嗜盐古菌细胞裂解的数量减少。当NaCl浓度提高到 10%时, OD_{600} 极小,且基本稳定。说明不同浓度NaCl 条件处理中极端嗜盐古菌细胞裂解的数量较少或基本没有菌体裂解。如图显示NaCl浓度为 10%或以上时,极端嗜盐古菌细胞能够保持完整形态。因此 OD_{600} 法可用于测定极端嗜盐古菌保持细胞完整形态的NaCl浓度。

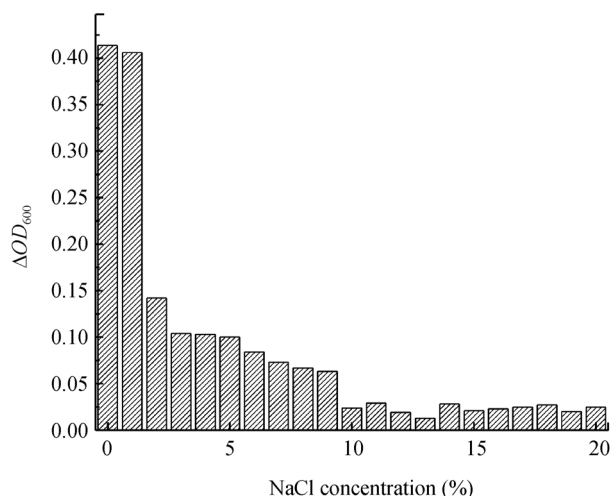


图 1 ΔOD_{600} 值与NaCl浓度的关系

Fig. 1 The relationship between OD_{600} and concentration of NaCl

2.2 显微观察

简单染色进行镜检并结合显微照相来观察细胞裂解情况。染色后油镜下照得的显微照片,如图 2 所示:随 NaCl 浓度的不断提高,当 NaCl 浓度低于 6%时,如图 2 中 a、b、c 所示,几乎观察不到清晰的细胞形态,说明大部分菌体裂解;当 NaCl 浓度处于 8%~10%时,如图 2 中 d、e 所示,基本能够观察到

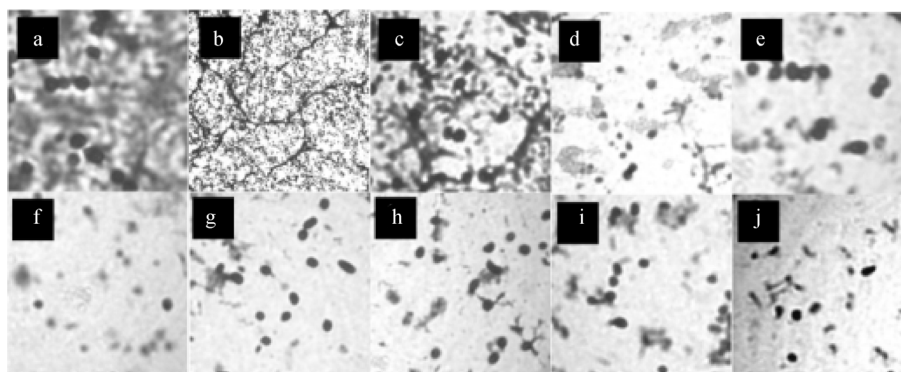


图2 极端嗜盐古菌 CY1 的简单染色照片

Fig.2 Simply staining of extremely halophilic archaea

将生理盐水改成为不同浓度地 NaCl 溶液, 分别进行涂布, 其他步骤不变。NaCl 浓度(W/V)分别为 a: 0% (蒸馏水); b: 2%; c: 4%; d: 6%; e: 8%; f: 10%; g: 12%; h: 14%; i: 16%; j: 18%

Treat with different concentration of NaCl in simply staining. The concentration of NaCl was: a: 0% (ddH₂O); b: 2%; c: 4%; d: 6%; e: 8%; f: 10%; g: 12%; h: 14%; i: 16%; j: 18% respect

清晰的细胞形态, 说明较少菌体裂解; 而当 NaCl 浓度高于 10% 时, 如图 2 中 f、g、h、i、j 所示, 能够观察到清晰的细胞形态, 说明没有菌体裂解。因此, 简单染色结合显微观察可以直接用于观察不同的 NaCl 浓度下菌体的裂解的情况。

Kushner 等以盐离子浓度为指标, 把嗜盐菌划分为五大类, 开创了嗜盐菌分类的新标准, 他将嗜盐菌分为非嗜盐、弱嗜盐、中等嗜盐、极端嗜盐和耐盐菌^[2]。所以嗜盐菌的耐盐度在其分类学等方面的意义重大。目前关于极端嗜盐古菌的最低耐受的盐离子浓度的报道有很多。其中关于研究嗜盐菌耐受盐浓度的方法也有多报道。徐德强等 1995 年用 OD_{480} 测定盐单胞菌的耐盐度^[11]。陶卫平等 1996 年报道, 当盐浓度低于 1.6 mol/L 时, 细胞开始破裂^[5]; 田新玉等 1997 年用 OD_{460} 报道嗜盐菌在盐浓度低于 12% 不能生长^[12]。徐晓红等 2005 年亦用 OD_{460} 鉴定嗜盐菌的生长条件^[6]。田新朋等 2006 年报道大多数极端嗜盐菌的生长盐浓度在 10% 以上^[13]。潘海莲等 2006 年在报道极端嗜盐菌的生长盐浓度至少在 1.5 mol/L 以上^[14]。我们采用几种不同的方法研究嗜盐古菌保持完整细胞形态的最低盐浓度。通过 OD_{600} 法, 测得保持嗜盐古菌完整的细胞形态的最低 NaCl 浓度(W/V)为 10%; 综合上述 OD_{600} 法和显微观察法相结合可较准确测定, 保持嗜盐古菌完整细胞形态的最低 NaCl 浓度。

通过以上实验, 我们建立了较完善的测定嗜盐菌保持完整细胞形态的最低盐离子浓度的方法, 为后续研究嗜盐菌的分类提供更加系统、可靠的实验方法, 同时为更好的开发极端环境微生物资源提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 吕爱军, 胡 斌, 温洪宇, 等. 极端嗜盐菌的特性及其应用前景. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 65–68.
- [2] 唐蜀昆, 李文均, 张永光, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. 微生物学报, 2003, 30(4): 15–19.
- [3] 安立超, 严学亿, 胡 磊, 等. 嗜盐菌的特性与高盐废水生物处理的进展. 环境污染与防治, 2002, 24(5): 293–296.
- [4] 张立丰, 肖延青, 刘会强, 等. 嗜盐嗜碱菌的研究进展. 新疆师范大学学报, 2005, 24(3): 90–92.
- [5] 陶卫平. 嗜盐菌的嗜盐机制. 生物学通报, 1996, 31(1): 23–24.
- [6] 徐晓红, 吴 敏. 嗜盐古生菌 AJ6 的分离及系统发育分析. 浙江大学学报, 2005, 32(1): 83–88.
- [7] 李 卫, 刘艳丽, 曹海华, 等. 两株中度嗜盐菌的分离与生理生化分析. 兰州大学学报, 2003, 39(4): 58–61.
- [8] Offner S, Waner G, Pfeifer F. Functional stuides of the gvpACNO operon of *Halobacterium salinarum* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(7): 2071–2078.
- [9] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2005, pp. 97–99.
- [10] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2005, pp. 26–28.
- [11] 徐德强, 黄静娟, 张纪忠, 等. 微盐单胞菌属一新种-黄海盐单胞菌. 微生物学学报, 1995, 35(5): 315–321.
- [12] 田新玉, 徐 毅, 刘洪灿, 等. 嗜盐嗜碱杆菌属的一个新种. 微生物学通报, 1997, 37(1): 1–6.
- [13] 田新朋, 张玉琴, 唐蜀昆, 等. 云南黑井古盐矿可培养极端嗜盐古菌初步研究. 微生物学通报, 2006, 33(6): 1–7.
- [14] 潘海莲, 周 成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究. 微生物学学报, 2006, 46(1): 1–6.