

文章编号:1001-5132(2008)02-0186-04

一株新属紫色非硫光合细菌的初步鉴定

王龙刚, 潘志崇, 张德民

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用特异性培养基对采自宁波象山地区养殖虾池底泥样品进行富集、分离和纯化, 得到了一株紫色非硫细菌(PNSB), 依据形态特征观察、无机碳源利用、活细胞吸收光谱测定、*pufM* 基因检测及 16S rRNA 基因序列分析等实验, 初步鉴定其为 comamonadaceae 科中一新属。

关键词: 紫色非硫光合细菌; *pufM* 基因; 16S rDNA

中图分类号: Q939

文献标识码: A

光合细菌是一类能利用光能、具有复杂代谢功能的微生物。据Bergey's细菌分类手册记载^[1,2], 仅不产氧光合细菌就有 27 属、66 种。近几年又陆续有一些新的属、种的报道^[3-5]。紫色非硫细菌(Purple Nonsulfur Bacteria, PNSB)是光合细菌中最重要的一大类, 是不产氧光合细菌中种属最多、分布最广、形态生理生化特征最为多样、系统发育最为复杂的一群^[6]。紫色非硫细菌代谢类型多样, 具光合、固碳、降解大分子有机物、固氮、脱氮、硝化、反硝化、硫化物氧化等多种功能, 且细胞富含蛋白质、氨基酸等多种生理活性物质, 因而成为具有净化养殖水体、增加动物营养、促进生长和增强防病抗病能力等功能的重要微生物资源。

目前, 紫色非硫光合细菌主要应用于水产养殖、污水处理、生产单细胞菌蛋白、能源开发等方面, 在基础研究方面以表型特征研究为主^[7-9]。本课题组从养殖虾池分离到一株光合细菌, 对其从形态特征、无机碳源利用、活细胞光吸收特征图谱、*pufM* 基因及 16S rRNA 基因序列等方面进行了系统的研

究, 发现其与已有菌种有较大的差异, 初步鉴定为一株新属紫色非硫光合细菌。

1 材料与方法

1.1 样品来源及培养基

研究所用水样及泥样均来自宁波象山一养殖虾塘。用Biebl and Pfennig's培养基^[10]富集培养, 用RCVBN培养基^[11]纯化菌株。

1.2 菌种的分离与纯化

取 1 g 池底泥样和 1 mL 水样置于 25 mL 装满富集液体培养基的厌氧试管中, 在 30 ℃、3 000 ~ 5 000 lx 的光照培养箱中培养 7 d, 富集样品进行 10 倍系列稀释, 取 10^{-8} ~ 10^{-6} 稀释度的菌液 1 mL 加入厌氧试管中, 然后加入 25 mL 半固体分离培养基, 密闭后再于光照培养箱中培养 7 d。从稀释管中挑取单菌落, 在富集液体培养基中培养 7 d, 再重复半固体培养基深层逐级稀释法, 用纯化培养基反复纯化 2 ~ 3 次, 直到培养基中没有其他杂菌菌落出

现, 并通过光学显微镜(日本奥林巴斯CX-31)观察直到获得纯菌株为止。

1.3 菌株的形态学观察

厌氧液体培养物和单菌落形态特征分别通过厌氧试管和稀释管直接观察; 纯化了的单菌落接种到平板培养基上, 在 30 ℃ 培养 7 d, 记录其好氧下的菌落形态; 用光学显微镜观察菌体形态及大小。

1.4 菌株基本特征的测定

1.4.1 无机碳源利用试验

将培养基中的碳源换成浓度为 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 , 菌种接入量均为 3%, 并各设 3 个平行组, 厌氧光照培养 1 周后观察试验结果。

1.4.2 活细胞吸收光谱测定

将菌液在 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 取沉淀用生理盐水洗涤 1~2 次, 加入 60% 蔗糖溶液至原体积, 以 60% 蔗糖溶液做参比, 用 UV-3100PC 型紫外可见分光光度计检测菌液的活细胞吸收光谱, 波长范围为 300~1 000 nm。

1.4.3 *pufM* 基因检测

细菌基因组 DNA 提取按照张德民等^[12]的方法进行, 将提取的 DNA 基因作为 PCR 模板。应用光合细菌功能基因 *pufM* 引物 PCR 扩增该片段, 反应体系及反应条件参照文献^[13]。

1.5 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序

用细菌通用性引物(27f~1541r)PCR 扩增细菌的 16S rDNA, PCR 反应体系和反应条件参照文献^[14], 用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 送上海生物工程技术公司进行序列测定, 将所得序列用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行相似性检索。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学特征

利用软琼脂深层逐级稀释法, 从样品中分离、纯化到 1 株光合细菌, 命名为 Y10。光照厌氧条件

下菌液呈红色, 单菌落为球状、红色, 直径为 2~4 mm; 菌体呈杆状, 大小为 $(1.5 \sim 2.5) \mu\text{m} \times (0.4 \sim 0.5) \mu\text{m}$ 。菌株在好氧条件下形成圆形粉红色菌落, 直径约 1~2 mm, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 有光泽。这些培养特征显示该菌株属于紫色非硫细菌。

2.2 Y10 菌株在 NaHCO_3 中的生长情况

试验结果进一步显示, 分离纯化得到的 Y10 菌株在以碳酸氢钠为碳源的培养基中能进行自养生长。这一结果表明该菌株能利用无机盐碳酸氢钠作为唯一碳源和电子供体。

2.3 光合细菌活细胞吸收光谱

Y10 菌株的活细胞经紫外可见分光光度计连续扫描, 其色素吸收光谱如图 1 所示, 在波长 376~380 nm、587~593 nm、801~805 nm 及 860 nm 附近均出现最大吸收峰, 表明 Y10 菌株含有细菌叶绿素 a; 在波长 465~470 nm、492~498 nm、523~528 nm 则出现 3 个特征吸收峰, 表明有正常螺菌黄质素的类胡萝卜素存在。由此可见: Y10 菌株活细胞中含有光合作用所必需的细菌叶绿素 a、类胡萝卜素。

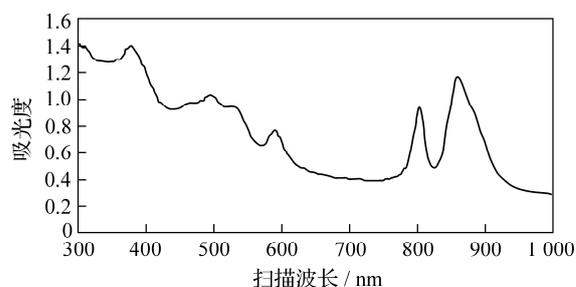


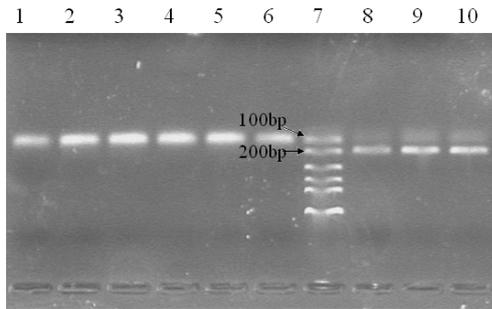
图 1 Y10 菌体活细胞吸收光谱

2.4 *pufM* 基因

应用光合细菌功能基因 *pufM* 引物对菌株 Y10 的 *pufM* 基因进行 PCR 扩增, 结果获得了 190 bp 的扩增片段(图 2), 与 Beja 等人^[13]扩增的 *pufM* 基因一致, 这一结果表明该菌株含有 *pufM* 功能基因, 进一步证明该菌株为紫色非硫光合细菌。

2.5 16S rRNA 基因的测序及比对结果

将菌株 Y10 的序列送入数据库进行相似性分析, 结果表明, 在最相近的 30 个序列中, 没有光



lane 1~6(阴性对照): *E. coli*; *Vibrio fluvialis*; *Vibrio proteolyticus*; *Bacillus firmus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Microbulbifer hydrolyticus*; lane 7: Marker; lane 8: Y10; lane 9~10(阳性对照): *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*; *Rhodopseudomonas palustris*

图2 Y10的 *pufM* 基因扩增产物的琼脂糖电泳图

合细菌种。其中 18 个序列为 *Comamonas* 属, 相似性绝大多数在 98% 以上, 相似性最高(99%)的种为 *Comamonas aquatica*; 另外 12 个序列为 *Acidovorax* 属, 相似性都在 97% 以下, 这 2 个属都隶属于 *comamonadaceae* 科, 但都不是光合细菌。该科中有 *Rhodoferrax*、*Roseateles* 及 *Rubrivivax* 3 个属为光合细菌, 分别将其与 Y10 相比对, 结果发现相似性均较低(分别为 93%、91%、91%)。因而判定该种菌株不属于 *comamonadaceae* 科中现有的任何一个属, 应该为该科中的一新属。

3 小结

(1) 菌株的形态学特征、无机碳源利用情况、活细胞光吸收图谱和 *pufM* 基因等特性表明: Y10 菌株应归属于紫色非硫光合细菌。

(2) 16S rRNA 基因测序及比对结果表明该种菌株不属于 *comamonadaceae* 科中现有光合细菌的任何一个属, 应为一新属种。

因此, 根据本研究结果可初步鉴定 Y10 为一株隶属于 *comamonadaceae* 科一新属的紫色非硫光合细菌。

参考文献:

[1] Staley J T, Holt J G. *Bergey's manual of systematic*

bacteriology[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.

- [2] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [3] Overmann J, Fischer U, Pfening N. A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments *Thiorhodovirbrio Winogadskyi* gen. nov. and sp. nov[J]. *Arch Microbiol*, 1992, 157(4):329-335.
- [4] Zhang D M, Yang H F, Zhang W, et al. *Rhodocista pekingensis* sp. nov., a cyst-forming phototrophic bacterium from a municipal wastewater treatment plant[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53:1 111-1 114.
- [5] 张德民, 黄志勇, 杨惠芳. 紫色非硫细菌 *Rhodocista* 属一新分离株的鉴定及其系统学研究[J]. *微生物学报*, 2000, 40(1):14-20.
- [6] Oda Y, Star B, Huisman A L, et al. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:5 186-5 191.
- [7] 沈锦玉, 刘问, 尹文林, 等. 光合细菌 HZPSB 菌株的分离鉴定及其生长特性的测定[J]. *科技通报*, 2005, 21(1):69-73.
- [8] 李彦芹, 张涛, 李凤超, 等. 对虾养殖池底泥中光合细菌分离及其生物学特性[J]. *河北大学学报*, 2006, 26(1): 61-65.
- [9] 姜华, 李爽, 张德民, 等. 对虾池中紫色非硫细菌的分离及初步鉴定[J]. *辽宁师范大学学报*, 2007, 30(2):220-222.
- [10] Biebl H, Pfennig H. *Isolation of members of the family Rhodospirillaceae*[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- [11] Weaver P F, Wall J D, Gest H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*[J]. *Arch Microbiol*, 1975, 105:207-216.
- [12] 张德民, 黄志勇, 杨惠芳, 等. 几株红假单胞菌属细菌的表观特征及其遗传多样性研究[J]. *微生物学报*, 2000, 40(3):229-236.
- [13] Beja O, Suzuki M T, Heidelberg J F, et al. Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs [J]. *Nature*, 2002, 415: 630-633.
- [14] 钱丽群, 张德民, 徐小红. 应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性[J]. *水产学报*, 2007, 31(2): 204-210.

