

文章编号: 1674 - 5566(2011)06 - 0866 - 07

原生质体融合选育耐高温耐盐红螺菌的研究

谢航, 陈婕, 邱宏端

(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108)

摘要: 为选育耐高温耐盐红螺菌用于其粉状制剂研制, 以降解水产养殖水体亚硝基氮功能达90%以上的耐盐红螺菌与能在60~70℃下生长的嗜热脂肪芽孢杆菌为出发菌株, 通过正交试验探讨2种菌株的原生质体融合条件。分别对融合子进行温度、生长盐度和净化水质等功能测定, 检出性能较优的融合子, 同时采用电镜、细胞色素吸收光谱等方法, 将融合子优良株与2种亲株进行比较鉴别。实验结果表明, 2种菌株原生质体融合的最优条件为温度37℃, 作用时间3h, 聚乙二醇(PEG)浓度为40%。在该优化条件下原生质体融合率为1.536%, 筛选获得3株能在30~50℃良好生长的融合子(a、b、c)。融合子生长耐受温度较耐盐红螺菌亲株提高66%, 但耐受盐度、降解养殖水体氨氮与亚硝基氮功能均与耐盐红螺菌亲株相近。其中融合子a菌株具有生长更快、性能更稳定的特点, 其细胞形态特征、革兰氏染色属性、色素吸收峰等均与耐盐红螺菌相似。

研究亮点: 对较不耐热但具有高效降解亚硝基氮作用的耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌进行原生质体融合, 筛选与检出3株耐热性提高、降解水体亚硝基氮高效且在30~50℃生长良好的融合子。其中融合子a菌株生长更快, 性能更稳定, 更适合用于研制粉状制剂。
关键词: 耐盐红螺菌; 嗜热脂肪芽孢杆菌; 原生质体融合; 选育; 耐高温
中图分类号: S 917.1
文献标志码: A

当前, 水产养殖规模发展迅猛, 水产养殖病害频发, 抗菌素的滥用导致了病原菌的耐药性、水体生态破坏与水产动物药物残留等害处。红螺菌科光合细菌微生态制剂具有无毒、无副作用、无污染、无残留和安全可靠的优越性, 在促进动物生长、净化水质和提高水产动物抗病能力等方面的研究应用已十分广泛^[1-4]。但是, 红螺菌科细菌一般较适合的生长温度为30℃, 40℃以上就不能生长。由于其耐热性能较差, 致使研制粉状菌剂较为困难。目前, 红螺菌剂产品较多为液体制剂, 存在着包装运输不便、菌剂质量不稳定等缺点^[5], 对水产养殖的应用效果及促进菌剂生态养殖带来了不利影响。为此, 对于农业应用菌株, 如何改造使其提高应用效能与生产便利性的研究具有重要意义。耐盐红螺菌是一株能在0.1%~4.0% NaCl下生长, 降亚硝基氮功能达90%以上的菌种, 嗜热脂肪芽孢杆菌则可在60~

70℃下生长。本文以这两种菌为出发菌株, 采用原生质体融合技术拟筛选出耐高温且具有高效净化亚硝基氮的耐盐红螺菌, 从而为其研制粉状制剂及推广应用奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

耐盐红螺菌, 嗜热脂肪芽孢杆菌为生物实验室选育保存菌种。

1.1.2 培养基

光合细菌基础培养基^[6]: CH₃COONa 3.0 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.3 g, MgSO₄ 0.2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.3 g, CaCl₂ 50 mg, 酵母膏 0.1 g, MnSO₄ 2.5 mg, FeSO₄ 5 mg, 蛋白胨 10 mg, 谷氨酸 0.2 mg, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4, 121℃下灭菌 20 min; 应用培养基: 由柠檬酸钠、

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-05-26

基金项目: 福建省发改委(2007)623号

作者简介: 谢航(1980—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为微生物遗传育种。E-mail: xiehang_11@sina.com

通讯作者: 邱宏端, E-mail: hongduanlq@163.com

NH_4Cl 、 MgSO_4 等成分配置而成。

嗜热脂肪芽孢杆菌基础培养基:牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 蛋白胨 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4 ~ 7.6, 121 °C 下灭菌 20 min, 此培养基也作为两亲株细胞破壁后的低渗平板培养基; 营养肉汤培养基:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 酵母膏 2 g, NaCl 5 g, 葡萄糖 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2, 121 °C 下灭菌 15 min。

原生质体再生高渗培养基:在营养肉汤培养基中添加蔗糖 157.8 g/L, MgCl_2 4.07 g/L, 氨基乙酸 5 g/L, 121 °C 下灭菌 15 min。

融合子改良培养基:在光合细菌应用培养基中添加蔗糖 0.1 g/L, MgCl_2 0.4 g/L, 氨基乙酸 0.7 g/L。

1.1.3 试剂和缓冲液

溶菌酶(纯度:20.000 u/MG 编号:LDB0308)购自生工生物工程(上海)有限公司; 钙离子溶液:每升含 147g CaCl_2 、pH 10.5 的原生质体稀释缓冲液, 聚乙二醇等试剂购自国药集团化学试剂有限公司, 皆为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌的原生质体制备

分别吸取培养至对数生长中期的耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌 5 mL 于离心管中, 置于 4 000 r/min 下离心 10 min, 除上清液, 再用 3 ~ 4 mL 原生质体稀释缓冲液洗涤, 同上述条件离心后, 对耐盐红螺菌采用酶解温度 37 °C、溶菌酶量 1.0 mg/mL、酶解时间 3 h 处理; 而对嗜热脂肪芽孢杆菌采用酶解温度 50 °C、溶菌酶量 1.0 mg/mL、酶解时间 5 h 处理。

1.2.2 嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体单亲灭活实验

将制备好的嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体置于 80 °C 水浴中, 加热一定时间取样进行 10 倍稀释, 取一定稀释液涂布于原生质体高渗培养基, 置于 50 °C 下培养 12 ~ 14 h 后, 观察嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体再生情况。以灭活率刚好达到 100%, 即灭活后在再生平板上生长率为 0 时为最佳灭活条件。

1.2.3 耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌的原生质体融合条件优化

采用正交试验探讨助融剂(聚乙二醇 PEG)、

融合温度与时间对两种菌原生质体融合的影响, 优化原生质体融合的最佳条件。具体步骤为: 分别将两种菌原生质体用各自的培养基稀释至相同浓度, 并与一定体积的助融液混合, 加入 3 倍于总体积的融合液稀释, 摇匀, 静置一定时间后在 5 000 r/min 条件下离心 10 min, 除上清液, 并将两种菌原生质体融合液稀释 4 倍, 涂布在原生质体再生高渗培养基上, 置于 50 °C 下培养 24 h 观察菌落生长情况, 后挑取单菌落进行传代实验, 选择多次传代均能在高温下稳定生长的单菌落进行斜面保藏。

1.2.4 融合子生理活性测定

(1) 将 2 种亲株与融合子活化后接种于融合子改良培养基平板, 分别置于 30 ~ 70 °C 下培养, 观察各菌株在不同温度下的生长状况。

(2) 将 2 种亲株与融合子活化后, 分别涂布在不同盐浓度的融合子改良培养基平板上, 其中耐盐红螺菌与融合子置于 30 °C 下培养, 嗜热亲株置于 50 °C 下培养(培养温度下同), 观察各菌株在不同盐浓度下的生长状况。

(3) 以校园鱼塘中的淡水养殖水体为基质, 制备氨氮和亚硝基氮浓度分别为 18 mg/mL 和 6 mg/mL 的养殖水体培养基。按 5% 接种量分别接种 2 种亲株与融合子, 培养 24 h 后测定各菌株降解氨氮与亚硝基氮的效能^[7]。其中, 氨氮测定采用纳氏分光光度法^[8], 亚硝基氮测定采用 a-萘胺比色法^[8]。

(4) 分别将活化后的 2 种亲株与融合子以 10% 的接种量接入融合子改良液体培养基中, 并置于 30 °C 与 50 °C 下培养, 以 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 检测生物量, 比较融合子与两种亲株的生长差异。

1.2.5 融合子的鉴别

将 2 种亲株与试验筛选的融合子培养至对数中期, 分别进行个体电镜与菌落形态观察, 并进行革兰氏染色鉴定。

此外, 将 2 种亲株与融合子的细胞培养液经 12 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体用无菌生理盐水洗涤, 离心, 反复多次, 后将菌体悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 以紫外可见分光光度计(波长 300 ~ 900 nm)扫描法检测 2 种亲株与融合子的吸收光谱差别。

2 结果与分析

2.1 嗜热脂肪芽孢杆菌单亲灭活实验

由于原生质体融合中,如单亲灭活不完全,再生菌落的杂合体则会大大下降,从而影响杂合体的挑选^[9]。因此,本实验采用水浴法对嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体进行单亲灭活实验。由结果(图1)看出,嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体在水浴 80 °C 下 12 min 时灭活率达到 100%,由此表明 80 °C 处理 12 min 是嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体灭活的最佳条件。

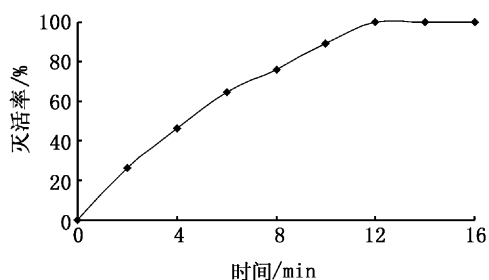


图1 嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体热灭活曲线

Fig.1 The inactivation curve of protoplast of *Bacillus stearothermophilus*

2.2 原生质体融合条件优化

采用正交试验,以原生质体融合率为指标,探讨温度、时间、PEG 浓度对融合率的影响。实验方案^[10]与结果见表 1、2。由结果表明,影响耐盐红螺菌和嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体融合率的因素主次顺序为温度 > 时间 > PEG 浓度。其中,温度对耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体融合的影响最为显著,而 PEG 浓度与作用时间的影响不显著。其最优条件组合为 A3B1C3,即温度 37 °C,作用时间 3 h,PEG 浓度为 40%。在此优化条件下融合率为 1.536%。试验经多次传代培养,筛选获得 3 株均能在 50 ~ 60 °C 下稳定生长的融合子(a、b、c)。

2.3 融合子生理活性检测

2.3.1 温度

将 2 种亲株与融合子(a、b、c)菌株分别涂布于融合子改良培养基平板上,置于不同温度下培养。结果显示,3 株融合子最适生长温度为 30 °C,但可以在 50 ~ 60 °C 下生长,表明其耐热性较亲株有较大幅度提高,融合子的耐热性具有嗜热细菌的特征(表 3)。

表 1 耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体融合的正交试验结果
Tab.1 The results of orthogonal test of protoplast fusion between salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria and *Bacillus stearothermophilus*

试验号	温度/°C A	时间/h B	PEG/% C	融合率/%
1	25	3	20	0.030
2	25	6	30	0.099
3	25	9	40	0.017
4	30	3	30	0.028
5	30	6	40	0.068
6	30	9	20	0.085
7	37	3	40	1.536
8	37	6	20	0.097
9	37	9	30	1.068
K ₁	0.146	1.594	1.183	T=3.028
K ₂	0.181	0.264	0.224	CT=1.018
K ₃	2.701	1.170	1.621	
$\overline{K_1}$	0.048	0.531	0.394	
$\overline{K_2}$	0.060	0.088	0.074	
$\overline{K_3}$	0.900	0.390	0.029	
R	0.852	0.443	0.365	

表 2 方差分析表

Tab.2 The results of variance analysis

方差来源	偏差平方和 S	自由度	方差	Fa	显著性
温度	0.873	2	0.438	51.35 > F _{0.05} (2,2) = 19	*
时间	0.225	2	0.113	13.235	
PEG 浓度	0.080	2	0.040	4.705	
误差 e	0.017	2	0.009		

表 3 温度试验结果

Tab. 3 The results of temperature experiment

温度	耐盐红螺菌	嗜热脂肪芽孢杆菌	融合子 a	融合子 b	融合子 c
30 ℃	+++	++	+++	+++	+++
50 ℃	-	+++	++	++	++
60 ℃	-	++	+	+	+
70 ℃	-	+	-	-	-

注:“+++”表示生长很好,“++”表示生长较好,“+”表示生长一般,“-”表示不长。

2.3.2 耐盐性能

将 2 种亲株与融合子(a、b、c)菌株分别培养在不同盐浓度的融合子改良培养基上。由结果看出,嗜热菌的耐盐性能最高,在盐度为 6 时还

能良好生长,而耐盐红螺菌与 3 株融合子在实验条件下还能良好生长的最大盐度为 3(表 4)。这表明 3 株融合子的耐盐性类似于光合细菌。

表 4 亲株与融合子的耐盐性能

Tab. 4 The salt-resistance performances of parent strains and fusants

盐度	耐盐红螺菌	嗜热菌	融合子 a	融合子 b	融合子 c
0	+++	+++	+++	+++	+++
1	+++	+++	+++	+++	+++
3	++	++	++	++	++
5	+	++	+	+	+
6	+	++	+	+	+
7	-	+	-	-	-
8	-	+	-	-	-

注:“+++”表示生长很好,“++”表示生长较好,“+”表示生长一般,“-”表示不长。

2.3.3 降解氨氮、亚硝基氮功能

降解氨氮和亚硝基氮是评价红螺菌的一个重要指标。由图 2 可知,嗜热脂肪芽孢杆菌降解氨氮、亚硝基氮性能均较弱,而选育的融合子降解氨氮、亚硝基氮的功能与亲株耐盐红螺菌相近,其中,氨氮降解率接近 30%,亚硝基氮降解率大于 95%。

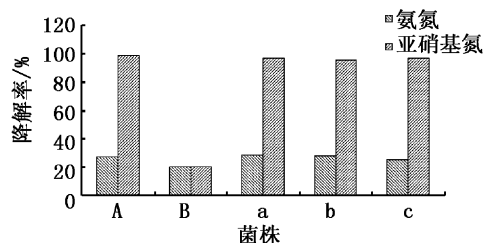


图 2 亲株与融合子的氨氮、亚硝基氮降解性能比较
Fig. 2 The comparison of degrading $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ of parent strains and fusants

A 为耐盐红螺菌; B 为嗜热脂肪芽孢杆菌; a 为融合子 a;
b 为融合子 b; c 为融合子 c。

2.3.4 生长量测定

将活化后的 2 种亲株与 3 株融合子分别以 10% 的接种量接入融合子改良培养基中,并置于 30 ℃ 与 50 ℃ 下培养,以 $\text{OD}_{660 \text{ nm}}$ 检测其生长差异。由图 3,4 可知:亲株耐盐红螺菌在 30 ℃ 下生长良好,50 ℃ 下基本不生长;嗜热脂肪芽孢杆菌则在 30 ℃ 下生长很差,50 ℃ 下生长良好;而 3 株融合子在两种不同培养温度下均能良好生长。其中,30 ℃ 下融合子培养 48 h 达到最高生长量,而 50 ℃ 下只需培养 18 h 即达到最高生长量。试验表明,3 株融合子的耐热性能较亲株耐盐红螺菌均明显提高。另比较 3 株融合子的生长情况,可以看出融合子 a 在两种温度下的最大生长量相似,且优于融合子 b、c 菌株。为此,后续试验应研究融合子 a 菌株的细胞特性。

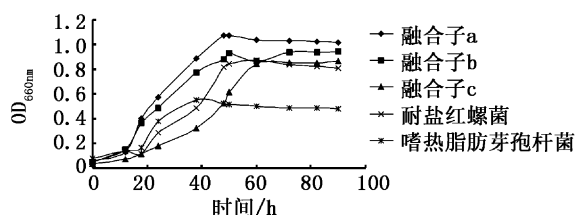


图3 30 °C下亲株与融合子的生长曲线比较
Fig. 3 The comparison of growth curves of parent strains and fusants at 30 °C

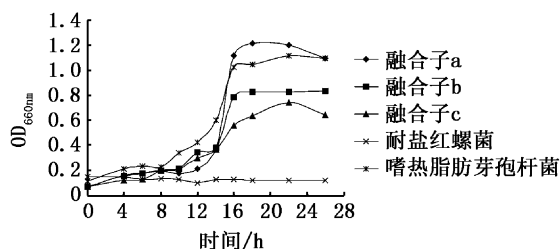


图4 50 °C下亲株与融合子的生长曲线比较
Fig. 4 The comparison of growth curves of parent strains and fusants at 50 °C

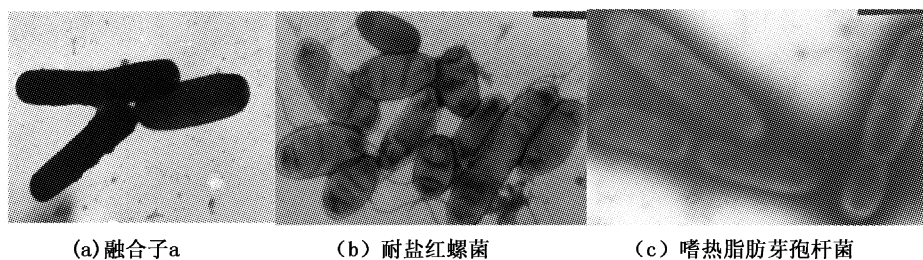


图5 亲株菌与融合子 a 菌株电镜下的细胞形态图

Fig. 5 The cell shape of parent strains and fusant a by electron microscope

2.4.2 色素吸收光谱检测

表5表明,融合子 a 菌株的细胞色素吸收峰的出峰位点与耐盐红螺菌较为相似。其中,最大吸收峰的出峰位点(486.0nm)与耐盐

2.4 融合子 a 菌株的细胞特性

2.4.1 细胞形态与革兰氏染色属性

将融合子 a 菌株以及 2 种亲株培养至对数生长中期后,进行革兰氏染色制片并分别置于油镜与电镜下观察。由图 5 可知,嗜热脂肪芽孢杆菌多为长杆状,耐盐红螺菌的菌体多为卵圆形及短杆状,而融合子 a 的菌体形态介于 2 种亲株菌之间。从革兰氏染色结果看,融合子 a 菌株与耐盐红螺菌相同为革兰氏阴性菌,而嗜热脂肪芽孢杆菌为革兰氏阳性菌;从菌落特征看,耐盐红螺菌菌落较小(1.5 ~ 1.8 cm),形态突起、光滑、较细密、圆点、白色或淡黄色,嗜热细菌菌落较大(4.0 ~ 4.3 cm),形态突起、光滑、细密、圆、淡黄或白色透明,而融合子 a 菌株的菌落大小介于 2 种亲株菌之间(2.0 ~ 2.4 cm),形态隆起、乳白色、光滑、菌落大而圆。

红螺菌的最大吸收峰位点(490nm)基本一致,表明融合子 a 的细胞特性与亲株耐盐红螺菌更为相近。

表5 吸收光谱法测定结果

Tab. 5 The results of absorption spectroscopy

菌种	λ 吸收峰/nm				
耐盐红螺菌	310.0	344.0	376.0	490.0	805.0
嗜热菌	307.0	312.0	326.0		
融合子 a	365.0	376.0	486.0		

3 结语

耐盐红螺菌是实验室前期选育的能在淡水与海水养殖中高效净化亚硝基氮的光合细菌,为

提高菌种的耐热性,本文以耐盐红螺菌与嗜热脂肪芽孢杆菌为出发菌株,采用原生质体融合技术选育耐高温耐盐的红螺菌,探讨 2 种菌原生质体融合的条件。通过正交试验,获得 2 种菌原生质

体融合的最优条件为温度 37 ℃,作用时间 3 h, PEG 浓度为 40%。在此优化条件下原生质体融合率为 1.536%,并筛选获得 3 株能在 50 ℃下良好生长的融合子。正交试验分析表明,温度对融合率的影响最为显著。但本次原生质体融合中采用 PEG 融合所获得的融合率均偏低,这可能由于 PEG 对细胞具有毒害作用,其作用时间过长或作用量过大等所致^[11]。

对 3 株融合子与 2 种亲株的生长温度和耐受温度、耐盐性能以及净化养殖水体氨氮与亚硝基氮效能进行比较,结果显示,融合子的最适生长温度为 30 ℃,但在 50 ℃下也能生长良好;融合子的耐盐性能与净化养殖水体氨氮与亚硝基氮效能与耐盐红螺菌相似。其中融合子 a 菌株的生长活性最高,其个体形态、细胞大小、革兰氏染色属性、细胞色素吸收峰等均与亲株耐盐红螺菌相似。这表明通过嗜热脂肪芽孢杆菌与耐盐红螺菌的原生质体融合,筛选获得了耐高温性能较亲株耐盐红螺菌有明显提高的耐盐红螺菌种。由于融合子细胞最适生长温度较低,而又能在 50 ℃或 60 ℃下不死亡,这为培养菌种研制粉状制剂奠定了良好基础。为此,在后续试验中我们将继续对融合子 a 菌株的培养与菌剂研制进行研究。

参考文献

- [1] 李勤生. 光合细菌的基本特性及其在水产养殖中的应用研究概况[J]. 水利渔业,1995(1):3-5,24.
- [2] 邱宏端,徐姗楠,林娟,等. 耐盐红螺菌拮抗物质的分离纯化及特性分析[J]. 水产学报,2005,29(3):362-366.
- [3] 王有基,胡梦红,朱焕青,等. 光合细菌对鲤鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 水利渔业,2005,25(6):38-39.
- [4] 付保荣,曹向宇,冷阳,等. 光合细菌对水产养殖水质和水生生物的影响[J]. 生态科学,2008,27(2):102-106.
- [5] 李彦芹,阚振荣,穆淑梅,等. 光合细菌研究进展[J]. 河北大学学报:自然科学版,2005,25(5):554-560.
- [6] 邱宏端,腾蓉,陈雪鸣,等. 荚膜红假单胞菌应用型扩大培养液的优化试验[J]. 大连水产学院学报,2001,16(1):29-33.
- [7] 邱宏端,石贤爱,郭养浩. 耐盐和降高 NH_4^+ 、 NO_2^- 红螺菌科细菌的选育及应用[J]. 水产学报,1999,23(s):92-96.
- [8] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 3版. 北京:中国环境科学出版社,1989:246-252,252-256.
- [9] 陈代杰,朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵控制技术[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1995:130-147,337-378,379-381.
- [10] 田胜元,萧日嵘. 实验设计与数据处理[M]. 北京:中国建筑工业出版社,1996:219.
- [11] HOPWOOD D A, WRIGHT H M, BIBB M J. Genetic recombination through protoplast fusion in streptomycetes[J]. Nature, 1977, 268:171-174.

Study on the breeding of *Rhodospirillaceae* bacteria with salt-resistance and high temperature-resistance by protoplast fusion

XIE Hang, CHEN Jie, QIU Hong-duan

(College of Biological Science And Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China)

Abstract: In order to breed *Rhodospirillaceae* bacteria with high temperature-resistance and salt-resistance for powdery agent-manufacture, the conditions of protoplast fusion between salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria which could degrade N-nitroso over 90% and *Bacillus stearothermophilus* which grew at 60 – 70 °C were studied using orthogonal test. The physiological characteristics of fusants such as temperature, growth salt and purifying the water were determined and the identifications between parent strains and the excellent fusant by electron microscope and absorption spectroscopy were studied. The results showed that the optimal conditions of protoplast fusion were as follows: temperature 37 °C, reaction time 3h and the adding amount of PEG 40%. Under these conditions, the rate of protoplast fusion was 1.536% and three fusants (a, b, c) which could grow well at 30 – 50 °C were obtained. The tolerance of growth temperature of three fusants was improved by 66% than salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria, but some characteristics of salt-resistance, degrading N-ammonia and N-nitroso were similar to it. Fusant a grew faster and steadier than other fusants and its characteristics of cell shape, Gram stain and pigment absorbing peak were similar to salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria.

Key words: salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria; *Bacillus stearothermophilus*; protoplast fusion; breeding; high temperature-resistance