

文章编号:1673-1689(2008)04-0116-06

一株沼泽红假单胞菌的鉴定及产类胡萝卜素的 research

李福枝, 周晓媛, 曾晓希, 邓靖

(湖南工业大学 绿色包装与纳米生物技术应用省重点实验室, 湖南 株洲 412008)

摘要: 作者通过革兰氏染色、鞭毛染色、扫描电镜对一株光合细菌进行了形态学特征观察, 并通过平板培养、液体培养特征、生理生化试验来了解其培养特征和生理生化特征; 同时还通过双光束紫外-可见光谱仪分析了其活体细胞和细胞色素的光谱吸收行为。研究了其产类胡萝卜素的培养基和培养条件, 并通过高效液相色谱仪对类胡萝卜素成分进行了分析。结果表明, 此菌株为革兰氏阴性、有极生鞭毛, 细胞为杆形, 有集束生长的习惯, 不对称出芽分裂, 细胞大小为 $(0.6\sim2.5)\mu\text{m}\times(0.6\sim5.0)\mu\text{m}$; 单菌落在固体平板培养基上呈淡黄色, 表面光滑湿润, 边缘整齐; 在液体培养基上的培养物为深红色; 对氨基苯甲酸、酵母浸出物对菌株的生长有显著刺激作用; 菌体细胞色素含有类胡萝卜素和叶绿素a。根据这些形态学和生理生化特征, 初步确定该菌株为沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)。此菌在培养基组成为(g/L): KH_2PO_4 0.6, K_2HPO_4 0.9, 醋酸钠 2.0, 氯化铵 1.5, 酵母浸膏 0.5, NaCl 0.5, 硫酸镁 0.3, 氯化钙 0.2。在 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、1500 lx, pH 6.5~8.5条件下培养能够快速生长繁殖。通过HPLC分析表明: 类胡萝卜素提取液中成分至少有10种, 其中5种是主要成分。

关键词: 形态学特征; 生理生化特征; 沼泽红假单胞菌; 培养基; 培养条件; 高效液相色谱

中图分类号: Q 920.1

文献标识码: A

Identification of a Strain of *Rhodopseudomonas palustris* and Researches on Its Carotenoids Production

LI Fu-zhi, ZHOU Xiao-yuan, ZENG Xiao-xi, DENG Jing

(Key Lab of Green Packing and Application of Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412008, China)

Abstract: In this study, a bacteria was identified as Gram-negative, in shape of ovoid or rod, with flagellum on one end, $0.6\sim2.5\mu\text{m}\times0.6\sim5.0\mu\text{m}$ size, living together rose knottily, bud reproduction dissymmetrically. It showed light yellow on solid substrate and dark red in liquid substrate. This bacteria was sensitive to para aminobenzoic acid, especially yeast extract paste. It had carotenoids and chlorophyll-a. According the Bergey's manual systematic bacteriology, the strain was identified to be *Rhodopseudomonas palustris*. The optimized culture medium were potassium dihydrogen phosphate 0.6 g, dipotassium hydrogen phosphate 0.9 g, yeast-extract 0.5 g, sodium acetate 2.0 g, ammonium chloride 1.5 g, sodium chloride 0.5 g, magnesium sulfate 0.3 g, calcium chloride 0.2 g, distilled water 1000 mL. Ten kinds of carotenoids were found by

收稿日期: 2007-09-24.

作者简介: 李福枝(1978-), 女, 湖南常德人, 工学硕士, 讲师, 主要从事药物与天然产物方面的研究.

Email: li-fu-zhi@163.com

HPLC, and five were the main components among the ten.

Key words: morphological characteristics; biochemical characteristics; *Rhodospirillum rubrum*; culture medium; culture conditions; HPLC

光合细菌是一类能进行光合作用而不产氧的特殊生理类群的总称,广泛存在于海洋、湖泊、污泥、土壤中,在自然界的碳素、氮素、硫素转化循环中起重要作用。光合细菌在高浓度有机废水处理与资源化、水产养殖的水质调控与促进健康生长、农业生产中作为高效活性菌肥等方面都发挥着积极作用。同时,还被应用于新能源的开发、保健品与抗癌药的研制以及类胡萝卜素的提取。沼泽红假单胞菌是光合细菌的一种,目前在这方面的研究主要集中在污水处理和饲料添加剂方面^[1-2],如白红娟等发现菌株对 Cd²⁺ 的去除主要在细胞壁上^[3], Joong 等发现沼泽红假单胞菌能够大大提高鱼类的存活率和成长率^[4]。在产类胡萝卜素方面,国内研究的比较多,但还只是在初期研究阶段^[5]。作者从学校周边池塘底泥中分离获得一株光合细菌,并对其进行了鉴定,并对其产类胡萝卜素的培养基和培养条件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种来源:湖南工业大学周边池塘 1~1.5 m 处底泥经分离筛选而来。

1.2 主要仪器

双光束紫外可见分光光度计: TU-1901, 北京普析通用制造;光照培养箱: PXY-400G-B, 湖南省科力仪器厂制造;液相色谱仪: LC-20A, 岛津仪器公司制造;显微镜: NIKON TE2000, 日本 NIKON 公司制造。

1.3 鉴定方法

1.3.1 分离筛选方法 用 Van Neil 培养基对池塘浅底的污泥进行连续厌氧光照培养 5 d, 取其红色培养物接种于相同的基本培养基, 连续厌氧光照培养 5 d; 如此接种培养 3 次后, 再平板划线分离, 直到获得单个菌落为止, 从中挑选强壮的菌株接种于富集培养基。培养条件为光照强度 1 500 Lux, 温度 30 ℃, 连续厌氧培养 5 d。

1.3.2 菌落形态观察 将分离筛选后的菌株进行平板培养, 记录菌落的生长特点, 同时记录液体培养基中的生长特点。平板培养和液体培养的菌落

形态均采用数码相机拍摄保存。

1.3.3 菌体形态观察 采用革兰氏染色法、硝酸银染色法并结合光学显微镜、透射电子显微镜来观察。

1.3.4 基质利用实验和生理生化实验 根据《常见细菌系统鉴定手册》中的生理生化试验内容进行^[6], 并根据文献^[7-8]鉴定菌种。

1.3.5 菌体活细胞的检测方法 使用 TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计, 取生长旺盛期的菌液在 660 nm 下进行紫外-可见光谱吸收扫描。

1.3.6 细胞色素的提取方法和表征方法 细胞色素提取方法见文献^[9-10], 略有改动。细胞色素表征方法采用紫外-可见光谱法、高效液相色谱法。

1.4 培养基和培养条件的研究

1.4.1 基础培养基和培养方法 基础培养基参见 vanNiel 培养基^[11] (g/L): KH₂PO₄ 0.6, K₂HPO₄ 0.9, NaAc 0.5, NH₄Cl 0.3, 酵母浸膏 0.5, MgSO₄ 0.2, CaCl₂ 0.3, NaCl 0.5 g, 微量元素溶液 1 mL/L, 生长因子溶液 1 mL/L, 121 ℃ 灭菌 15 min。光照强度 1 000 Lux, 30 ℃ 厌氧培养 5 d。

1.4.2 正交设计试验 选用 L₉ (3⁴) 正交表, 对 1.4.1 中的基础培养基进行一次正交设计试验, 以找出类胡萝卜素产量高的优化培养基, 试验因素和水平见表 1。

1.4.3 培养条件的研究 在优化培养基的基础上对培养温度、光照强度和 pH 值进行研究, 以得到优化培养条件。

表 1 正交设计试验

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal design

因素	水平		
	1	2	3
A(醋酸钠, g)	1.0	2.0	3.0
B(氯化铵, g)	0.5	1.5	2.5
C(微量元素溶液 + 生长因子溶液, mL)	各 2	各 1	各 0

1.5 高效液相色谱法

色谱柱 Spherisorb ODS-2, C₁₈, 4.6 nm×250 nm, 5 μm 粒度; 流动相 A 为甲醇: 水=95: 5, B 为乙酸乙酯; 洗脱梯度: 0~10 min, 0~25% B; 10~15

min,25%~33% B;15~20 min,33%~50% B;20~25 min,50%~25% B;25~30 min,25% B。流速:1.0 mL/min,进样量为 20 μ L,柱温为 24 $^{\circ}$ C,检测器波长为 475 nm。

1.6 类胡萝卜素质量的计算方法

取 1 L 菌液,沉淀分离细胞后提取类胡萝卜素,测定所得的类胡萝卜素溶液在波长 475 nm 下的吸光值(Abs 值),再计算类胡萝卜素的质量。计算公式为:

总类胡萝卜素质量(ug) = (A₁ × V × N × 10⁴)/ w × A₀^[12]

A₁ 为样品的吸光值(475 nm); A₀ 为标准样的吸光系数(475 nm),一般为 2 500(类胡萝卜素的平均消光值); N 为提取液的稀释倍数; V 为样品的体积 mL; W 为样品总质量(g)。

2 实验结果

2.1 菌株的形态学特征

将经过分离纯化得到的菌株进行平板培养和液体培养,记录其平板菌落特点和液体培养特点。同时进行革兰氏染色、硝酸银染色观察和扫描电镜观察菌株形状和大小,此菌株为革兰氏阴性菌、有极生鞭毛,细胞为杆形,有集束生长的习惯,有玫瑰结形成,生殖方式为不对称出芽分裂,细胞大小为(0.6~2.5) μ m×(0.6~5.0) μ m。单菌落在固体平板培养基上呈淡黄色,表面光滑湿润,边缘整齐。在液体培养基上的培养物为深红色。

2.2 活细胞吸收光谱的测定

图 1 为菌体活细胞的紫外-可见吸收光谱图,可以看出,菌体活细胞在 380、600、800、861 nm 处有吸收峰,而且在 440~520 nm 范围内有肩峰。这是光合细菌尤其是红假单胞菌属的特征吸收^[11-13]。因细菌叶绿素在 360、600、790 nm 左右有吸收峰,类胡萝卜素在 450~480 nm 范围内有肩峰,所以,可以初步判定菌体活细胞含有类胡萝卜素和叶绿素。

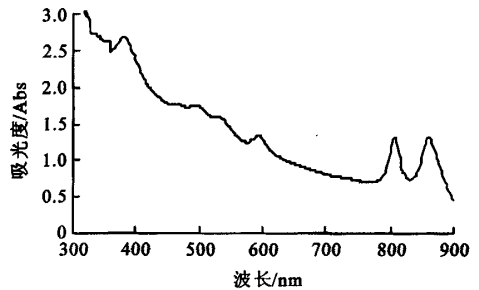


图 1 活菌体吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of live cell

2.3 生理生化试验

表 2 是根据《常见细菌系统鉴定手册》进行的生理生化试验^[7]。从表 2 可以看出,菌株能够利用醋酸钠、酵母浸膏、丁二酸钠、甘露醇、甲酸钠、苯甲酸钠、柠檬酸钠、硫代硫酸钠、对氨基苯甲酸和各种铵盐;菌株在多数情况下不能利用糖类如蔗糖、葡萄糖、半乳糖、果糖和精氨酸、天冬门氨酸等。其中,酵母浸膏对菌株的生长有显著的刺激作用。

表 2 生理生化试验

Tab. 2 Biochemical and physiological characteristics

碳源	生长情况	碳源	利用情况	碳源	利用情况
蔗糖	-/+	酒石酸钠	+	丁二酸钠	++
葡萄糖	-/+	柠檬酸钠	+	醋酸钠	++
半乳糖	-/+	乳酸钠	+	乙醇	+/-
果糖	+/-	甲酸钠	+	甘露醇	++
丙酮酸	-	苯甲酸钠	+	酵母浸膏	+++++
酒石酸	-	硫化钠	-/+	硫代硫酸钠	+
对氨基苯甲酸	+++	精氨酸	-	天冬门氨酸	-
氯化铵	+	硝酸铵	+	硫酸铵	+

注: + 表示能够生长, - 表示不能够生长

2.4 菌体色素的初步鉴定

按 1.3.6 中方法来提取菌体中的细胞色素和并加以表征。结果见图 2,3。从图 2 可以看出,在 420~520 nm 范围内,有 3 个吸收峰,分别为 430,

470, 509 nm 左右,是明显的类胡萝卜素特征吸收峰^[14]。从图 3 可以看出,在 360、600、790 nm 左右有明显的吸收峰,是叶绿素 a 特征吸收峰^[15-16]。由此可见,这种菌体内含有类胡萝卜素和细菌叶绿

素。

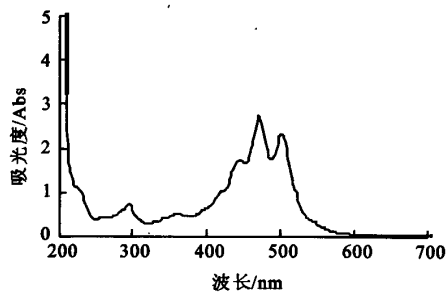


图 2 从菌体提取到的细胞色素 1

Fig. 2 First kind cytochrome from the bacteria

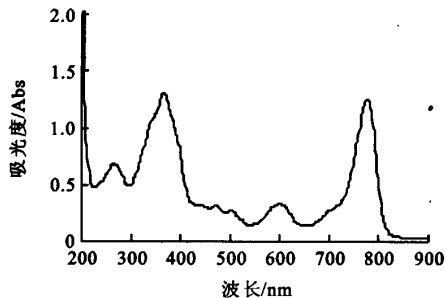


图 3 从菌体提取到的细胞色素 2

Fig. 3 Second kind cytochrome from the bacteria

2.5 优化培养基

由表 3 可看出,在正交设计试验中主要影响因素是醋酸钠和氯化铵,微量元素影响很小。从表 4 中的方差分析结果可以看出,醋酸钠和氯化铵对类胡萝卜素产量的影响均显著,微量元素不显著。所以,正交设计实验的最佳组合为 $A_2B_2C_3$ 。结合基础培养基得出优化培养基为(g/L): KH_2PO_4 0.6, K_2HPO_4 0.9, 醋酸钠 2.0, 氯化铵 1.5, 酵母浸膏 0.5, NaCl 0.5, 硫酸镁 0.3, 氯化钙 0.2。

2.6 优化培养条件

使用优化培养基,改变培养温度,连续厌氧光照培养 5 d 后,测定各个培养温度下的类胡萝卜素产量,结果见图 4。从图 4 可以看出,类胡萝卜素的产量随温度的变化而变化,相比之下,在 28 ℃ 下类胡萝卜素产量最高,30 ℃ 次之;温度高于或低于 28 ℃ 时,产量均会受到不同程度的影响。

同样,测定菌株在不同光照强度下的类胡萝卜素产量,结果见图 5。可以看出,在 1 500 lx 下类胡萝卜素产量最高;光照强度低于 1 500 lx 时,类胡萝卜素产量减少,光照强度高于 1 500 lx 时,产量呈增加趋势,但是十分缓慢。

表 3 正交设计试验的直观分析

Tab. 3 Straight analysis of orthogonal design

试验号	A 醋酸钠	B 氯化铵	D 微量元素溶液+生长因子溶液	空列	类胡萝卜素 质量浓度/($\mu\text{g/L}$)
1	1(1.0 g)	1(0.5 g)	1(各 2 mL)	1	493
2	1	2(1.5 g)	2(各 1 mL)	2	738
3	1	3(2.5 g)	3(各 0 mL)	3	508
4	2(2.0 g)	1	2	3	775
5	2	2	3	1	1 125
6	2	3	1	2	795
7	3(3.0 g)	1	1	2	601
8	3	2	2	3	782
9	3	3	3	1	628
I/3	579.667	623.000	690.000	748.667	Σ 6 445
II/3	898.333	881.667	713.667	711.333	
III/3	670.333	643.667	744.667	688.333	
R	318.666	258.667	54.667	60.334	

表 4 正交设计试验的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of orthogonal design

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性($p<0.5$)
醋酸钠	161 752.889	2	29.077	19.000	*
氯化铵	123 979.556	2	22.287	19.000	*
微量元素	4 509.556	2	0.811	19.000	
误差	5 562.89	2			
总合	295 804.891	8			

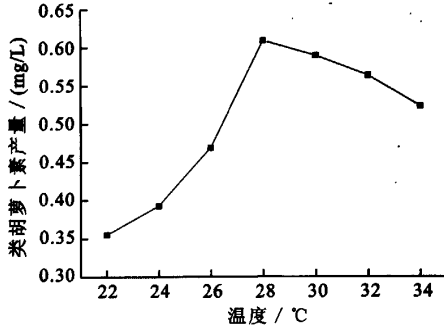


图 4 温度对产类胡萝卜素的影响

Fig. 4 Effect of different cultivating temperature on carotenoids production

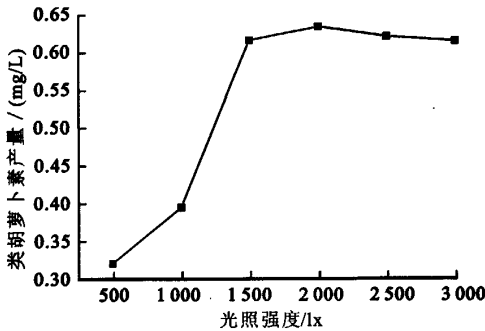


图 5 光照强度对产类胡萝卜素的影响

Fig. 5 Effect of different illumination intensity on the production of carotenoids

使用优化培养基,将培养温度、光照强度分别固定在 28 °C, 1 500 lx, 改变 pH 值使分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 连续厌氧光照培养 5 d 后, 提取并测类胡萝卜素的含量, 结果见图 6。从图 6 可看出, 在 pH 7.0 时类胡萝卜素的量达到最大值。同时还可看到, 在 pH 值 6.5~8.5 范围内, 类胡萝卜素产量变化很小。pH 值在 6.5~8.5 范围内对类胡萝卜素产量的影响不大。

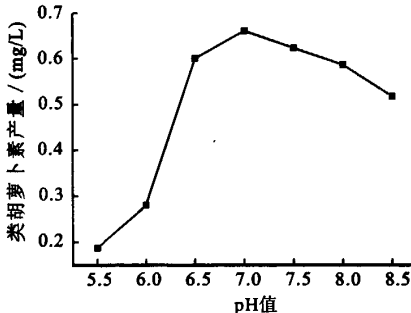


图 6 pH 值对产类胡萝卜素的影响

Fig. 6 Effect of different pH value

2.7 类胡萝卜素成分分析

图 7 是类胡萝卜素的乙醚提取物的 HPLC 图, 从图 7 可以看出, 所有物质在 25 min 内分离完, 并且提取物中至少包含有 10 种类胡萝卜素物质, 其中 5 种(峰面积大)为主要成分。

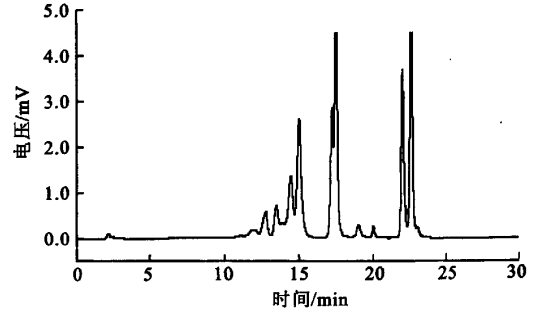


图 7 乙醚提取物中类胡萝卜素 HPLC-C₁₈ 柱的分离色谱图

Fig. 7 Chromatogram of carotenoids extraction by HPLC

3 结 语

作者分离得到的菌株为革兰氏阴性菌、有极生鞭毛, 细胞为杆形, 有集束生长的习惯, 有玫瑰结形成, 生殖方式为不对称出芽分裂, 细胞大小为 (0.6~2.5) μm × (0.6~5.0) μm。单菌落在固体平板培养基上呈淡黄色, 表面光滑湿润, 边缘整齐; 在液体培养基上的培养物为深红色, 这是沼泽红假单胞菌所特有的形态特征。生理生化实验表明, 该菌株能够利用苯甲酸钠、柠檬酸钠、硫代硫酸钠来繁殖生长, 对氨基苯甲酸尤其是酵母浸出物对其生长有显著刺激作用, 这是沼泽红假单胞菌同嗜酸红假单胞菌的明显区别。对菌体色素进行初步分析知, 该菌株含有类胡萝卜素和叶绿素 a。根据上述形态学和生理生化特征, 参照《伯杰氏系统细菌学手册》(第 8 版), 认为该菌株为沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*)。

通过正交设计试验得到优化培养基组成为 (g/L): KH₂PO₄ 0.6, K₂HPO₄ 0.9, 醋酸钠 2.0, 氯化铵 1.5, 酵母浸膏 0.5, NaCl 0.5, 硫酸镁 0.3, 氯化钙 0.2。同时通过试验得到优化培养条件为: 28 °C, 1 500 lx, pH 6.5~8.5。沼泽红假单胞菌在此优化培养基和培养条件下能够快速生长繁殖。通过 HPLC 分析表明: 类胡萝卜素提取液中成分至少有 10 种, 其中 5 种是主要成分。

参考文献(References):

- [1] 邱宏端,徐娜楠,朱航,等.耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J].水产学报,2002,26(3):231-236.
QIU Hong-duan, XU Shan-nan, ZHU Hang, et al. The influence of salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria on the water quality and bacterial population in the freshwater fish-ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26 (3):231-236. (in Chinese)
- [2] Sawada H. Photosynthetic bacteria in waste treatment[J]. *Ferment Technol*, 1997, 55:311-316.
- [3] 白红娟,张肇铭,负妮.沼泽红假单胞菌去除镉的研究[J].微生物学通报,2007(4):42-45.
BAI Hong-Juan, ZHANG Zhao-Ming, YUN Ni. Study on Removal of Cadmium by *Rhodopseudomonas palustris*[J]. *Microbiology*, 2007(4): 42-45. (in Chinese)
- [4] Kim Joong Kyun, Lee Bum-Byu. Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture[J]. *Aquaculture Engineering*, 2000, 23: 281-293.
- [5] 王俊卿,张肇铭.沼泽红假单胞菌的番茄红素含量[J].应用与环境生物学报,2004,10(5):660-662.
WANG Jun-qing, ZHANG Zhao-ming. Production of lycopene by *Rhodopseudomonas palustris*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004,10(5):660-662. (in Chinese)
- [6] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:364-398.
- [7] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984:16-29.
- [8] 高占争,赵允麟.产纤维酶米曲霉的筛选及诱变育种[J].食品与生物技术学报,2006,25(4):99-102.
GAO Zhan-zheng, ZHAO Yun-lin. Screening and mutagenesis of the fibrinolytic enzyme producing strain *Asperillus oryzae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 99-102. (in Chinese)
- [9] Emsl-August Hwinemeger, Karin Schmidt, Changes in carotenoid biosynthesis caused by variations of growth conditions in cultures of *Rhodopseudomonas acidophila* strain 7050[J]. *Arch Microbiol*, 1983, 134:217-221.
- [10] 韩雅珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,1992:119-120.
- [11] 刘如林,刁虎欣,梁凤来,等.光合细菌及其应用[M].北京:农业科技出版社,1991:79-88.
- [12] LIAAEN-Lessen. Quantitative Determination of Carotenoids in Photosynthetic Tissue[M]. New York: Plenum Press, 1969: 589-601.
- [13] 刘勇,张德咏.光合细菌 PSB-1 菌株的分离鉴定及其生物学特性的研究[J].生命科学研究,2000,4(4):233-239.
LIU Yong, ZHANG Deng-yong. Isolation and biological characteristics of photosynthetic bacterium strain PSB-1 [J]. *Life Science Research*, 2000,4(4):233-239. (in Chinese)
- [14] 范晓,张士瑾,秦松.海洋生物技术新进展[M].青岛:海洋出版社,1999:212-239.
- [15] Yong A, Brittton G. Carotenoids in Photosynthesis [M]. New York: Tokyo Melbourne and Madras, 1993.
- [16] Jeffrey S W, Mantoura R F C, Wright S W. Phytoplankton Pigments in Oceanography guidelines to Modern Methods[M]. Mayenne: UNESCO Publishing, 1997.

(责任编辑:李春丽)