

文章编号: 1005—8893 (2000) 04—0018—02

产聚羟基烷酸菌株的分离与鉴定^{*}

张 咏

(常州技术师范学院 化学工程系, 江苏 常州 213001)

摘要: 从常州西郊采土壤样品 3 个, 进行细菌的富集及分离纯化。在产聚羟基烷酸 (PHA) 的培养基上筛选了 6 株 PHA 产生菌。通过形态培养特征和生理生化特性的研究, 将其中 4 株鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)

关键词: 分离; 聚羟基烷酸; 鉴定

中图分类号: Q 93—331

文献标识码: A

合成塑料已是当今社会不可缺少的重要材料, 然而它们的废弃物由于不能被降解, 每年以 2 500 万吨的速度在地球上大量积累, 严重污染了人类的生存环境。尤其在我国的农用地膜日渐得到广泛应用, 其碎片滞留于土壤中会破坏土壤的结构和性质, 妨碍农作物的生长。因此, 开发可降解的聚羟基烷酸 (PHA) 已成为生物工程界研究热点之一^[1, 2]。

能产生 PHA 的微生物分布极广, 包括光能化和能自养及异养菌计 65 个属中的许多种^[1]。作者从不同来源的菌种中筛选了 6 株 PHA 产生菌, 并鉴定出其中 4 株菌应归入芽孢杆菌属内。为今后利用原生质体融合技术提高 PHA 产量的研究提供了基础条件。

1 材料和方法

1.1 样品来源

分离菌种的土壤样品共 3 个, 分别采自常州西郊的麦田, 公路边和校园的松树下。

1.2 菌种来源

41 与 5—10 菌株为土壤分离菌, C₂₀₋₁₁、2—37、H₂、6—1 菌株为江苏石油化工有限公司生物化工

实验室保存菌种。

1.3 培养基

1.3.1 细菌培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, pH 7.0~7.2。

1.3.2 产 PHA 培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 葡萄糖 0.5%, pH 7.0~7.2。

1.4 PHA 染液

0.3%苏丹黑染色液: 将苏丹黑 B 0.3 g 与 100 mL 70%乙醇混合, 用力振荡, 放置过夜备用。

1.5 细菌的富集与分离纯化

1.5.1 细菌的富集

将 50 mL 细菌培养基加入 250 mL 三角瓶, 再加入 1 g 土壤样品, 30 °C 摇瓶培养 19 h。

1.5.2 细菌的分离纯化

吸取富集后的培养物 0.5 mL, 经生理盐水适当稀释后, 取 0.1 mL 均匀涂布于细菌培养基平板上, 放入恒温箱。37 °C 培养 19 h 后, 挑取单菌落, 接入细菌培养基斜面上。37 °C 培养 18 h 后, 镜检, 若为单一形态的菌落则放入冰箱保存。若不纯, 则再进行划线、分离, 反复几次后得到纯培养

* 收稿日期: 2000—10—12

作者简介: 张咏 (1969—), 女, 江苏金坛人, 讲师。

菌种。

1. 6 PHA 染色

按常规方法制取菌悬液涂片，用 0.3%苏丹黑染色液染 10 min 后，水冲洗染液，滤纸吸干水份。以二甲苯冲洗涂片至无色素洗脱，再用 0.5%蕃红染色液复染（1~2）min，水洗，吸干。

1. 7 产 PHA 菌株的筛选

将细菌接入产 PHA 培养基斜面上，37℃培养 48 h，经苏丹黑染色液染色后，用显微镜观察。若细胞内有蓝黑色颗粒，即为产 PHA 菌株。将筛选标准定为：显微镜视野中 60%以上的细胞内含有蓝黑色颗粒的菌株入选。

1. 8 鉴定方法

参考文献 [3] 介绍的方法对 41、5—10、H₂、6—1 菌株进行了形态及培养特征观察、革兰氏染色、需氧性测定和接触酶测定等实验。

2 结 果

2. 1 产 PHA 菌株的筛选

共筛选出产 PHA 的菌株 6 个，分别为 41、5—10、C₂₀₋₁₁、H₂、2—37 和 6—1 菌株。

2. 2 鉴 定

待鉴定菌株为 41、5—10、H₂ 和 6—1 菌株。

2. 2. 1 形态特征

41、5—10、H₂ 和 6—1 菌株的个体形态特征见表 1。

表 1 鉴定菌株的个体形态特征

菌株编号	菌体	革兰氏反应	芽 孢		
			形状	位置	芽孢囊
41	杆状	G ⁺	椭圆	中生	不膨大
5—10	杆状	G ⁺	椭圆	中生	不膨大
H ₂	杆状	G ⁺	椭圆	中生或端生	不膨大
6—1	杆状	G ⁺	椭圆	中生	不膨大

2. 2. 2 培养特征

在细菌培养基上，41、5—10、H₂、6—1 菌株的培养特征见表 2。

表 2 鉴定菌株在细菌培养基上的培养特征

菌株编号	菌落形状	菌落边缘	表面状态	颜色	透明度
41	圆形	较规则	微光泽	乳白色	不透明
	扁平生长		较光滑		
5—10	圆形	规则	有光泽	乳白色	不透明
	扁平生长		有皱折		
H ₂	圆形	不规则	无光泽	乳白色	不透明
	扁平生长		有皱折		
6—1	圆形	不规则	无光泽	乳白色	不透明
	扁平生长		有皱折		

2. 2. 3 生理生化特征

6—1、41、H₂ 菌株好氧和兼性厌氧，接触酶阳性。5—10 菌株好氧，接触酶阳性。

由以上特征，根据《细菌分类基础》将 6—1、H₂、41、5—10 菌株鉴定为芽孢杆菌（*Bacillus* sp.）。

参考文献:

[1] 陈琦, 黄和容, 易祖华. 微生物合成生物降解塑料研究现状与展望 [J]. 微生物学通报, 1994, 21 (5): 297—303.
[2] 文欣, 庄国强, 郑士民. 真养产碱菌利用高果糖浆积累聚β-羟基丁酸的研究 [J]. 微生物学报, 1995, 35 (2): 115—120.
[3] 王大帮. 细菌分类基础 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.

The Isolation and Identification of PHA Producing Strains

ZHANG Yong

(Department of Chemical Engineering, Changzhou Teachers College of Technology, Changzhou 213003, China)

Abstract: Strains were isolated from three soil samples collected from west suburb of Changzhou. Totally six strains which can produce PHA were obtained with the beef extract medium containing 0.5% glucose. According to the morphological and biochemical characteristics, four strains (41, H₂, 6—11, 5—10) were identified as *Bacillus* sp.

Key words: isolation; PHA; identification