

盐田嗜盐单胞杆菌的分离鉴定及其 PHB 积累的研究

隋丽英, 张娇娇, 许高超, 邓元告

(天津科技大学 海洋科学与工程学院 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457)

摘要: 微生物聚合物聚- β -羟基丁酸酯(PHB)具有良好的生物降解性、生物相容性和热塑性, 在环保、医药和农业领域具有广阔的应用前景。高 PHB 积累菌株的获得及其发酵条件的研究具有很好的实用价值。作者从渤海湾日晒盐场盐田卤水中分离出一株杆状细菌, 经 16S rDNA 序列测序比对, 确定为盐杆菌属(*Halomonas*), 命名为 *Halomonas* 100-16-2, 其最适生长盐度为 50~100, 最适生长 pH 为 7~8, 属中度嗜盐菌。在酸水解酪蛋白(7.5 g/L)的基础培养基中分别添加 0、10、20 和 30 g/L 葡萄糖, 研究盐度 100 条件下不同葡萄糖添加量对 *Halomonas* 100-16-2 生长和 PHB 含量的影响。结果表明, 随着葡萄糖浓度的增加, 该菌株的生长和 PHB 积累显著提高。葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时, 细胞干质量达 8.60 g/L, PHB 含量达到 5.57 g/L(即达到细胞干质量的 65%)。本研究为渤海湾盐田微生物资源的开发和利用提供了有价值的基础数据。

关键词: 嗜盐细菌; 盐杆菌属(*Halomonas*); PHB 积累; 葡萄糖

中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)05-0016-05
doi: 10.11759/hyxx20140223001

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)具有良好的生物降解性、生物相容性和热塑性等特点, 作为可降解塑料、医用植入体和其他精细化工原料, 广泛应用于医药、环保、农业和食品等领域^[1-2]。聚- β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是原核生物细胞中最常见的 PHA, 为一定粒度的脂溶性颗粒(直径 0.2~0.5 μm)。最新的研究表明, 疏水的 PHB 可在水产动物肠道内全部或部分降解为- β -羟基丁酸, 促进欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)幼鱼^[3]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenburgii*)幼体^[4]以及中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蚤状幼体^[5-6]和幼蟹^[7]的生长, 是一种具有应用潜力的水产养殖生物控制剂^[8]。

一些细菌在碳过量 and 氮缺乏等营养胁迫时, 大量积累 PHB 作为碳源和能量储备^[9], 其中包括淡水和海洋细菌(如: 肥大产碱菌(*Alcaligenes latus*), 嗜铜雷氏菌(*Cupriavidus necator*), 蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*), 真养雷尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)和重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)等)^[10]、嗜盐细菌(如: 玻利维亚盐单胞杆菌(*Halomonas boliviensis*)和古菌(如: 地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)和盐盒菌属(*Haloarcula* sp.)^[11-13]。嗜盐菌可在盐度 100 以上的环境中生存, 最适生长盐度不低于 50^[14]。虽然嗜盐菌生长相对较慢, 但特殊的高盐环境使其

在生产过程中受污染的可能性大大降低, 甚至可以进行敞开式培养^[15]; 而且通过渗透压变化裂解细胞, PHB 产物回收相对简单。因此利用嗜盐菌生产 PHB 具有较好的应用前景。

作者从中国渤海湾盐田分离出一株盐单胞杆菌 *Halomonas* sp., 对其表型和生理生化特性进行研究。以盐田卤水配制培养基, 研究葡萄糖对该菌株生长和 PHB 积累的影响, 旨在开发和利用盐田微生物资源。

1 材料与方 法

1.1 嗜盐细菌的分离纯化和鉴定

盐田卤水取自天津汉沽盐场蒸发池, 盐度为 100(Atago Refractometer-S28M)。采用改良的 CM 培养基^[16]进行细菌分离纯化, 即将酸水解酪蛋白(7.5 100, 取自同一盐池, 经消毒过滤后备用), 调节 pH 为 7.2~7.4(Mettler FE20K)。取 100 μL 卤水涂布于固体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d。从中挑取单菌落转入液体培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 r/min 下振荡培养 3~4 d

收稿日期: 2014-02-23; 修回日期: 2014-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31172427); “大学生创新创业训练”计划项目(201310057010)

作者简介: 隋丽英(1966-), 女, 天津人, 博士, 教授, 主要从事盐田生物和甲壳动物营养繁殖学研究, E-mail: suily@hotmail.com

后, 在固体培养基上划线培养。重复上述步骤两次, 进行菌株纯化。

收集培养 3 d 的菌液, 提取基因组 DNA(Axygen), 利用通用细菌引物扩增 16S rDNA, 扩增条件为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 29 次; 72℃ 10 min。细菌通用引物为: 正向引物 F27: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 R1462: 5'-ATCCAGCCGACGATTCCTAC-3'。扩增 16S rDNA 片段长度为 1500 bp, 测序后(上海生工), 与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对。从 GenBank 中选择同源性较高的已知菌株(>97%)作为参比对象, 利用 CLUSTAL X 和 MEGA 5.0 软件中 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

针对对数生长期的细胞, 进行革兰氏染色, 用扫描电子显微镜进行细胞形态观察(Hitachi SU 1510)。分别配制盐度为 0、50、100、150、200、250(pH 7.2~7.4)和 pH 为 5、6、7、8、9、10(盐度 100)的培养基, 接种后在 37℃ 下培养 24 h, 测定 OD_{600 nm}, 确定其最适生长盐度和 pH。挑取固体培养基培养 7 d 的单菌落于无菌 NaCl 溶液(100 g/L)中悬浮均匀, 接种至 API 20E 细菌鉴定测试盒(Biomérieux), 于 37℃ 下培养 10 d, 测定其产酶和碳源利用等生化特性。

1.2 葡萄糖对嗜盐细菌生长和 PHB 积累的影响

实验设 4 个组别, 每组 3 个平行。在含有酸水解酪蛋白(7.5 g/L)的基础培养基中, 分别添加 0, 10, 20 和 30 g/L 葡萄糖。向 300 mL 三角瓶中加入 100 mL 培养基, 细菌接种量为 2%(v/v), 在 37℃ 和 150 r/m 下震荡培养 11 d。

每 24 h 测定细胞干质量和细胞中 PHB 积累情况。取 3 mL 菌液, 7 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用蒸馏水洗涤 2 次, 离心收集菌体, 100℃ 下干燥 2 h 后获得细胞干质量^[12]。细胞中 PHB 含量采用紫外光谱法测定^[17-18]。配制质量浓度为 10 mg/L 标准 PHB 氯仿母液(Goodfellow, UK), 取一定体积的母液于比色管中, 使 PHB 终质量浓度分别为 0、1、2、3、4 和 5 mg/L。蒸干氯仿后分别加入 5 mL 浓硫酸, 在 100℃ 下水浴 30 min, 4℃ 水浴中冷却 10 min。以浓硫酸为参比, 测定 OD_{235 nm}, 绘制标准曲线。采用 Excel 对数据进行线性回归, 方程为 $y=0.1611x+0.0101$ ($R^2=0.9989$)。细胞中 PHB 浓度测定是将 1 mL 菌体培养液离心、洗涤和干燥后, 参照标准曲线中 PHB 的测定方法进行。

2 结果

2.1 *Halomonas* 100-16-2 的分离纯化和鉴定

对 16S rDNA 序列与 Genbank 数据进行 BLAST 比对分析表明, 该菌株与嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*)(NR042256)最相似, 命名为 *Halomonas* 100-16-2, Genbank 注册登记号为 KF697249(图 1)。菌落为乳白色, 表面光滑。细胞为棒状, 大小 (0.5~0.8) μm × (2.0~3.0) μm, 属革兰氏阴性菌(图 2)。最适生长 pH 为 7~8, 最适生长盐度为 50~100(图 3), 为中度嗜盐菌。

API 20E 细菌鉴定测试盒对其产酶和碳源利用等生化特性的测定结果表明, 该菌株不能产生 β-半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶、脲酶、色氨酸脱氨酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和明胶酶, 但能通过氧

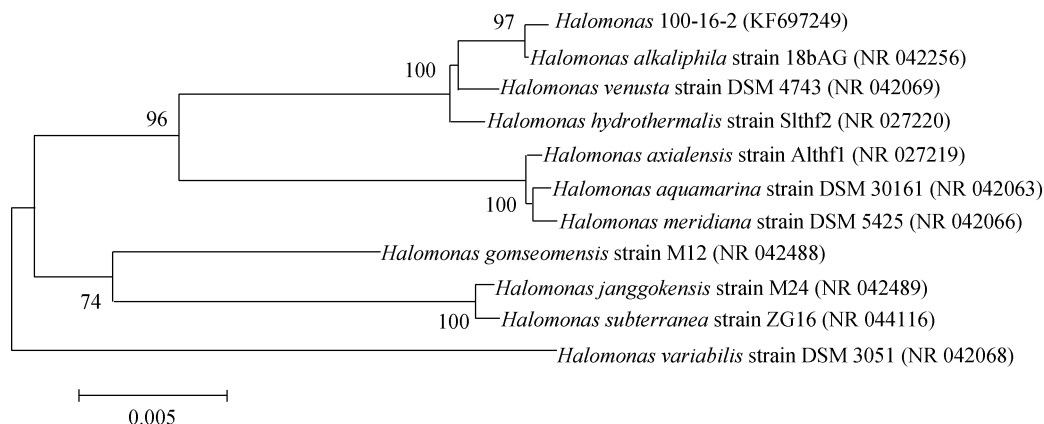


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建的分离菌株的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequence

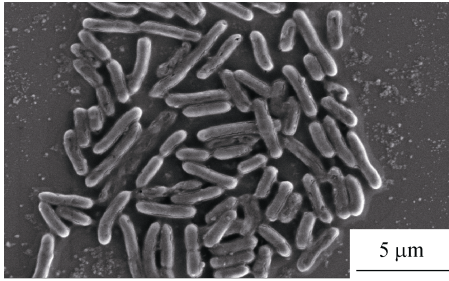


图2 电子显微镜下 *Halomonas* 100-16-2 细胞($\times 5000$)
Fig. 2 Cells of *Halomonas* 100-16-2 under electronic microscope ($\times 5000$)

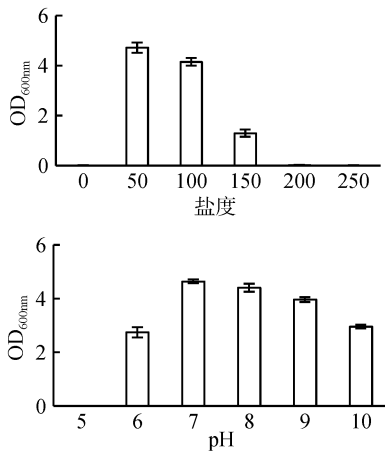


图3 *Halomonas* 100-16-2 在不同 pH 和盐度条件下培养 72 h 的细胞生长
Fig. 3 Growth of *Halomonas*100-16-2 cultured for 72 h at different pH and salinities

化或发酵 D-葡萄糖、肌醇、D-山梨醇、D-甘露醇、L-鼠李糖、D-蜜二糖、苦杏仁苷、D-蔗糖和 L-阿拉伯糖等产酸。

2.2 葡萄糖对 *Halomonas* 100-16-2 生长和 PHB 积累的影响

随葡萄糖添加量的增加, *Halomonas* 100-16-2 的细胞干质量显著提高(图 4)。葡萄糖质量浓度为 0、10 和 20 g/L 各组均在培养 5~6 d 时进入稳定期, 第 6 天细胞干质量分别达到 1.47、3.33 和 4.90 g/L。葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时, 虽然前期生长较 20 g/L 组慢, 但在其他组别进入生长稳定期后, 该组别细胞干质量持续增加, 第 11 天细胞干质量达到 8.60 g/L。

*Halomonas*100-16-2 细胞中 PHB 含量的增长趋势与细胞干质量的变化基本一致(图 5)。当葡萄糖质量浓度为 0 g/L 时, PHB 含量在第 3 天达到最高(0.18 g/L), 而后下降; 但葡萄糖质量浓度为 10 g/L 时, PHB 含量在第 4 天达到最高(0.60 g/L), 而后开始下降; 葡萄

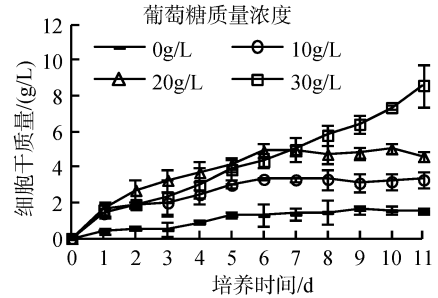


图4 不同葡萄糖质量浓度条件下 *Halomonas* 100-16-2 的生长

Fig. 4 Growth of *Halomonas* 100-16-2 at different concentrations of glucose

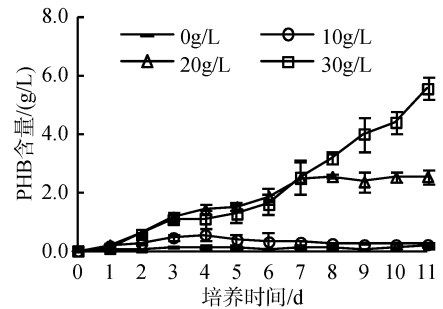


图5 不同葡萄糖质量浓度下 *Halomonas* 100-16-2 细胞中 PHB 含量

Fig. 5 PHB content in cells of *Halomonas* 100-16-2 at different concentrations of glucose

糖质量浓度为 20 g/L 时, PHB 含量在第 7 天达到最高(2.54 g/L), 而后基本维持在该水平; 但当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时, PHB 含量在第 11 天达到最高, 为 5.57 g/L。

3 讨论

在嗜盐细菌中, 盐杆菌科(*Halomonadaeae*)合成 PHA 的能力较强^[9], 已报道有 30 多个种属, 其中利用玻利维亚盐单胞菌生产 PHB 的研究最为广泛, 该菌株可以利用葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽低聚糖、乙酸钠和丁酸等为底物合成 PHB, 以农业副产品水解物为底物生产 PHB, 含量可达细胞干质量的 50%~56%。玻利维亚盐单胞菌培养盐度一般为 50^[12, 15], 较高盐度下细胞生长较为缓慢, 原因是高盐度下大量 ATP 用于积累胞内渗透压调节物质, 使细胞生长受到限制^[14]。本研究结果表明, 添加碳源对 PHB 的积累具有明显的促进作用, 在盐度 100 条件下, 细胞生长和细胞中 PHB 积累随葡萄糖浓度的增加显著提高。葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时 *Halomonas* 100-16-2 细胞干质量最高达 8.60 g/L, PHB 含量达到 5.57

g/L(即细胞干质量的 65%), 与 Tan^[15]等在盐度 60 和葡萄糖浓度 30 g/L 条件下, *Halomonas* sp. 细胞干质量达 6 g/L 和 PHB 含量达细胞干质量的 69%的研究结果接近。而 Quillaguaman^[12]等以乙酸钠、葡萄糖和蔗糖为碳源, 在 4.5% NaCl 盐度下培养玻利维亚盐单胞菌菌株 LC1, PHB 含量达到细胞干质量约 55%。Quillaguaman^[19]等利用流加培养方式, 即发酵开始时加入 0.4%NH₄Cl, 0.22%K₂HPO₄ 和 2%谷氨酸钠, 中间不加入任何营养盐, 最终玻利维亚盐单胞菌菌株 LC1 细胞干质量达到 44 g/L, PHB 含量达到细胞干质量的 81%, PHB 产量达到 1.1g/(L·h)。

积累 PHA 的细菌可分为两类: 一类细菌在氮、磷、镁、硫等微量元素缺乏而碳过量的条件下积累 PHB, 如真养雷尔斯通氏菌, *Protomonas extorquens*, *Protomonas oleovorans*; 另一类则不需要营养限制, 在细胞生长过程中积累, 如肥大产碱菌和重组大肠杆菌。多数情况下, PHB 的积累在营养缺乏的稳定期得到促进^[20]。本研究中葡萄糖质量浓度为 0 和 10 g/L 时, *Halomonas* 100-16-2 细胞生长缓慢, 细胞中 PHB 积累较少, 在第 3~4 天达到最大值后下降。在葡萄糖质量浓度为 20 g/L 时, 细胞生长显著高于前两组, 且 PHB 积累在第 7 天达到最大值后, 维持相对稳定的水平, 说明在该浓度下, 虽然细胞进入生长稳定期, 但碳源足以维持细胞生长, PHB 并没有降解。当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时, 碳源对细胞的生长和 PHB 的积累有很大的促进作用, 在实验周期内, 细胞生长和 PHB 积累都没有达到平台期。上述不同葡萄糖浓度条件下细胞生长和 PHB 积累的关系表明, PHB 的生物合成和降解是一个循环的机制, 即外界环境碳源过剩时, 碳源主要用于积累 PHB 作为能量贮存; 而当底物消耗殆尽时, PHB 开始降解为β-羟基丁酸单体, 作为能量和碳源使用^[21]。

本研究中 *Halomonas* 100-16-2 菌株来源于盐场蒸发池, 在分离和培养时利用离子成分丰富的盐田卤水配制培养基, 有利于菌株的生长^[22]。同时未添加无机氮磷和其他微量元素的培养基在配制上简单可行、成本低, 在卤水资源丰富的盐场或盐湖周边地区具有一定的实用价值。今后应进一步研究使用成本较低的碳源(如农副产品水解物), 并利用高盐条件下不宜污染的特点, 进行开放式培养, 以减少成本和高温高压灭菌操作对培养基有效营养成分的影响。

参考文献:

[1] Lauzier G C, Revol J F, Debzi E M. Hydrolytic

degradation of isolated poly-β-hydroxybutyrate (PHB) [J]. *Polymers*, 1994, 35(19): 4156-4162.

- [2] 刘宝全, 蒋本国. 聚β-羟基丁酸(PHB)研究进展[J]. 大连民族学院学报, 2000, 2(4): 15-16.
- [3] De Schryver P, Sinha A K, Kunwar P S, et al. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1535-1541.
- [4] Nhan D T, Wille M, De Schryver P, et al. The effect of poly-β-hydroxybutyrate on larviculture of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 76-81.
- [5] Sui L Y, Cai J L, Sun H X, et al. Effect of poly-β-hydroxybutyrate on Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae challenged with pathogenic *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(5): 359-364.
- [6] Sui L Y, Liu Y, Sun H X, et al. The effect of poly-β-hydroxybutyrate on the performance of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* Milne-Edwards) zoea larvae[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(3): 558-565.
- [7] 刘玉, 隋丽英, 邓元告, 等. 聚羟基丁酸酯对中华绒螯蟹幼蟹生和肝胰腺酶活力的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1333-1338.
- [8] Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P, et al. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 251-258.
- [9] Quillaguaman J, Guzman H, Van-Thuoc D, et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(6): 1687-1696.
- [10] Verlinden R A J, Hill D T, Kenward M A, et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(6): 1437-1449.
- [11] Chen C W, Don T M, Yen H F. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(11): 2289-2296.
- [12] Quillaguaman J, Delgado O, Mattiasson B, et al. Poly (β-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile *Halomonas boliviensis* LC1[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(1): 148-154.

- [13] Tanran M, Amirkhani H. Strategies of poly (3-hydroxybutyrate) synthesis by *Haloarcula* sp. IRU1 utilizing glucose as carbon source: Optimization of culture conditions by Taguchi methodology[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(5): 632-634.
- [14] Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity[J]. *Saline Systems*, 2008, 4: 2.
- [15] Tan D, Xue Y S, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01[J]. *Bioresource and Technology*, 2011, 102(17): 8130-8136.
- [16] Xu G C, Deng Y G, Song D H, et al. Isolation and characterization of a new moderately halophilic bacterium strain SM. 200-5 from solar saltern ponds[C]// *Proceeding of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology*, China, Tianjin. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014, 251 (2): 1023-1032.
- [17] 陈玲, 李礼尧. 聚 β-羟丁酸酯紫外检测方法的改进[J]. *无锡轻工大学学报*, 1997, 16(2): 27-31.
- [18] 孙慧贤, 隋丽英. 聚β-羟基丁酸酯(PHB)对卤虫幼体的强化作用: PHB 在水产育苗中应用方法的探究[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 392-398.
- [19] Quillaguaman J, Doan-Van T, Guzman H, et al. Poly (β-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in fed-batch culture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 227-232.
- [20] Lee S Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14(11): 431-438.
- [21] Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, et al. Ecological and agricultural significance of bacteria polyhydroxyalkanoates [J]. *Critical Review in Microbiology*, 2005, 31(2): 55-67.
- [22] Waise A C. Recovery of halophilic archaeobacteria from natural environment[J]. *FEMS Microbiology and Ecology*, 1988, 53(3-4): 211-216.

Isolation and identification of *Halomonas* sp. from solar saltpond and study of PHB accumulation in its cells

SUI Li-ying, ZHANG Jiao-jiao, XU Gao-chao, DENG Yuan-gao

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Received: Feb., 23, 2014

Key words: Halophilic bacteria; *Halomonas* sp.; PHB accumulation; glucose

Abstract: Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) is the polyester reserved in cells of microorganisms. It has biodegradable, biocompatible and thermoplastic characteristics, thus has a great potential of commercial application in the field of environmental protection, medicine and agriculture. It is important to obtain high-PHB accumulated bacteria and study their fermentation condition. A rod bacterial strain was isolated from brine water in saltpond of Bohai Bay coastal solar saltworks. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence indicated that the isolate was *Halomonas* sp., namely *Halomonas* 100-16-2. It is a moderately halophilic bacterium with optimal growth salinity of 50-100 and pH of 7-8, respectively. The effect of increasing glucose supplementation (at level of 0, 10, 20 and 30 g/L, respectively) on growth and PHB content of *Halomonas* 100-16-2. was investigated using basal culture medium containing 7.5 g/L acid-hydrolyzed casein. The results showed that glucose supplementation in the culture medium significantly improved the growth and PHB content of *Halomonas* sp. At a glucose concentration of 30 g/L, the cell dry weight and PHB content reached 8.60 g/L and 5.57 g/L (65% of cell dry weight). The current research has provided valuable data with respect of utilization of brine water bio-resources.

(本文编辑: 谭雪静)