

## 一株极端环境光合细菌的生理特性研究

杨素萍<sup>1,2</sup> 赵春贵<sup>2</sup> 曲音波<sup>1</sup> 钱新民<sup>1</sup>

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; 2. 山西大学生命科学系, 太原 030006)

**摘要:** 从山西运城盐厂解化池分离获得一株嗜盐嗜碱细菌, 编号为 Y。其纯培养物经形态学、生理生化特性和 DNA G + C 含量等特征分析, 结果表明, 该菌株可在盐度  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 160 和 pH9.0 碱性条件下生长。单细胞为杆状, 大小为  $0.4\text{--}0.8 \times 0.9\text{--}1.5 \mu\text{m}$ 。二分裂繁殖。革兰氏阴性。光合内膜为片层堆积并与细胞质膜相连, 但并不与细胞质膜平行。细胞含有细菌叶绿素 a, 液体培养物呈玫瑰红色。Y 菌株不仅可将硫化物氧化为元素硫沉积于细胞外, 也可光同化多种有机物, 并具有固氮和产 H<sub>2</sub> 特性。DNA 中 G + C 含量为 61.6%。根据以上鉴定特征及相关资料, Y 菌株应归于嗜盐红螺菌属 (*Halorhodospira*)。但其生长所依赖的盐度、pH、细胞内色素成分及鞭毛着生方式与该属正式承认的 3 个种有明显的不同。该菌株独特的生理生化特性, 对于极端环境微生物的资源开发和利用有重要的理论意义和应用价值。

**关键词:** 光合细菌; 嗜盐红螺菌属; 嗜盐; 嗜碱

**中图分类号:** Q938.8    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3207(2002)03-0221-05

近年来, 在光反应中心结构研究和固氮分子机理取得重大进展的同时, 以分子生物学指征为依据的分类学研究使光合细菌的分类地位发生了较大的变迁, 不断有新种和新属被报道<sup>[1-3]</sup>。极端光合细菌类群广泛存在于含有硫化物和盐碱极端环境中, 可在厌氧条件下利用太阳能以多种有机物进行光自养和光异养生长, 具有固氮、产氢和合成生物可降解塑料能力。菌体除含有丰富的光合色素外, 有资料报道在其细胞内存在多种抗胁迫因子, 具有稳定细胞内代谢酶和抵抗外界胁迫环境等功能。本文分离鉴定了一株嗜盐嗜碱的光合细菌, 并对其生理特性作了较详细的研究, 旨在为进一步研究其某些特性提供有价值的菌种和理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** Y 菌株从山西运城盐厂的解化池分离获得。对照菌株球形红杆菌 *Rhodobacter sphaeroides* 17023 (ATCC) 来自美国。

**1.2 培养基和培养条件** 初次富集采用盐度  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 100 和 pH8.0 的培养基<sup>[4]</sup>。再次转接和分离均采用盐度  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 160 和 pH8.0 的培养基<sup>[4]</sup>。根据样品生境,

收稿日期: 2001-03-09; 修订日期: 2001-04-20

基金项目: 山西省教委基金资助

作者简介: 杨素萍(1966—), 女, 山西省太原市人; 博士生, 副教授; 研究方向: 光合细菌的研究和应用

通讯作者: 曲音波 E-mail: lifezds@sdu.edu.cn

培养基稍做调整和改动。分离纯化按 Pfennig 琼脂振荡法进行<sup>[5]</sup>。黑暗好氧和微好氧培养按 Pfennig<sup>[6]</sup>方法进行。培养条件  $E = 3000—4000 \text{ lx}$ , 培养温度  $\theta = 30—35^\circ\text{C}$ 。

**1.3 形态** 对数期厌氧培养液通过革兰氏染色、鞭毛染色、厌氧载片培养、相差显微镜观察活细胞等方法确定细胞个体形态。电镜观察确定光合内膜结构类型。采用盐度  $\rho/\text{gL}^{-1} = 160$  的 1% 固体培养基进行菌落形态观察。

**1.4 有机碳源利用能力测定** 在删除乙酸盐的培养基中, 分别加入终浓度  $\rho/\text{gL}^{-1} = 1$  的各种有机碳源, 光照厌养培养一周后, 测定其  $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 。重复处理为 2, 连续转接 3 次。

**1.5 硫化物无机电子供体的利用能力的测定** 在删除硫化钠的培养基中加入其他相同浓度的还原性硫化物, 光照厌养培养一周后, 测定其  $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 。重复处理为 2, 连续转接 3 次。

**1.6 盐度和酸碱度对细胞生长的影响** 在乙酸盐液体培养基的其他成分均保持不变的条件下, 设置盐度 ( $\rho/\text{gL}^{-1}$ ) 分别为 50、100、140、160、180、200、220、250、300, 并调节最终 pH 为 8.5—9.0。将该菌株接种于装有上述不同盐度培养基的 50mL 血清瓶中, 光照厌养培养一周后测定其  $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 。在盐度 ( $\rho/\text{gL}^{-1}$ ) 160 的培养基中分别调节 pH 为 7.0、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0 和 12.0。光照厌养培养一周后测定其  $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 。两种试验均重复处理为 2, 连续转接 3 次。

**1.7 其他检测** DNA 中 G + C 含量的测定和活细胞光合色素成分的测定, 固氮酶和氢酶活性检测见文献<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 富集与分离

山西运城盐池属于内地盐湖, 各池均为超盐水体, 盐度 ( $\rho/\text{gL}^{-1}$ ) 为 58.18—279.18。其盐度、酸碱范围和微生物种群数量和结构随季节采样地点的不同而有所改变。原水样 pH 8.5, 经初次富集后培养液呈紫玫瑰红色, 镜检发现有胞外硫粒的积累。此富集液再经两次转接后, 用盐度  $\rho/\text{gL}^{-1}$  为 160, pH 为 8.5 的培养基进行分离。约一周左右, 琼脂管中长出红色透镜型菌落, 挑取典型菌落进行纯化。经反复镜检和厌氧载片培养, 确定为纯培养物。菌株编号为 Y。DNA 中 G + C 含量为 61.6%。

### 2.2 形态和培养特征

Y 菌株革兰氏阴性。单个细胞为杆状, 形态比较均一, 大小为  $0.4—0.5 \times 0.9—1.5 \mu\text{m}$  (图 1), 具极生鞭毛(图 2), 繁殖方式为二分裂。光合内膜结构为片层堆积并与细胞质膜相连(图 3、4)。单菌落于琼脂管中呈红色透镜型, 直径为 1mm 左右, 边缘整齐, 不分泌胞外色素。光照厌养培养物为玫瑰红色, 黑暗好氧为淡粉色。

### 2.3 细胞内光合色素组成

以球形红杆菌 17023 标准菌株为对照, 测定 Y 菌株的活细胞吸收光谱(图 5、6)。结果表明, 与 17023 菌株相比, 菌株 Y 细胞内也含有细菌叶绿素 a, 其特征吸收峰位于 375、595、800 及 850 及 890nm 处, 485、515 及 550nm 处的吸收峰表明了细胞内类胡萝卜素成分的存在。

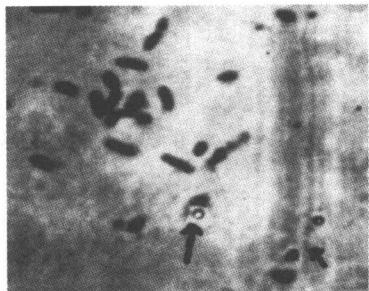


图 1 菌株 Y 的细胞形态和硫粒(1500×)

Fig.1 Light micrograph of strain Y cultured photoautotrophically with sulfide. Arrow indicated extracellular sulfur globules.

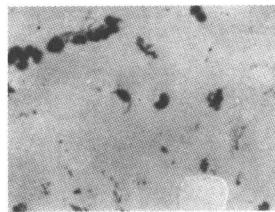


图 2 菌株 Y 的鞭毛着生方式

Fig.2 Light micrograph of strain Y Indicating the mode of flagella



图 3 菌株 Y 的光合内膜(37000×)

Fig.3 Ultrathin section of strain Y. Showing photosynthetic intracytoplasmic membrane.

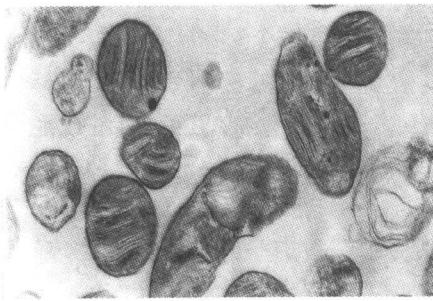


图 4 菌株 Y 的光合内膜(21000×)

Fig.4 Ultrathin section of a strain Y. Showing photosynthetic intracytoplasmic membrane.

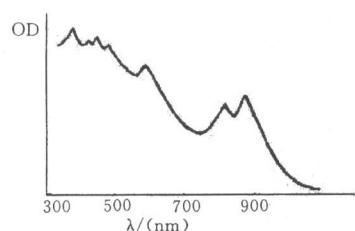


图 5 菌株 17023 活细胞吸收光谱

Fig.5 Absorption spectrum of live cell suspension of strain 17023

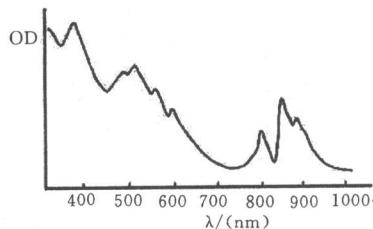


图 6 菌株 Y 活细胞吸收光谱

Fig.6 Absorption spectrum of live cell suspension of strain Y

#### 2.4 酸碱度对菌株生长的影响

Y 菌株在 pH7.5—9.0 范围内生长良好,最适生长 pH 为 8.5—9.0。在 pH10.0 细胞形态仍然无较大的变化。而在低于 pH7.0 的培养基中,Y 菌株难以生长。在整个生长周期内,培养基 pH 并无多大的改变。结果表明 Y 菌株为嗜碱菌。

#### 2.5 有机碳源、氮源和硫化物无机电子供体的利用能力的测定

在提供硫化物和碳酸氢盐的条件下,Y 菌株可光同化乙酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸及葡

葡萄糖等有机物进行生长。该菌株具有固氮酶和氢酶活性,可利用铵盐、谷氨酸和蛋白胨作为氮源进行生长。酵母提取物可刺激生长。Y 菌株在氧化还原性硫化物时产生的硫粒可沉积于细胞外(图 3),使培养基颜色发生相应的改变,但随后硫粒消失,表明硫粒可被进一步被代谢。

## 2.6 NaCl 浓度对生长的影响

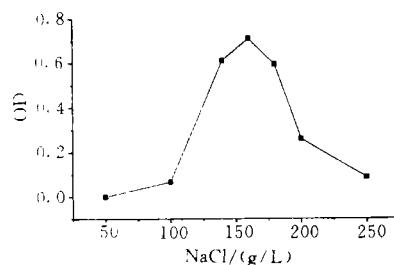


图 7 NaCl 浓度对 Y 菌株生长的影响

Fig. 7 Effect of NaCl concentration on strain Y

Y 菌株在低于  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 100 的 NaCl 的培养基中难以生长。在盐度  $\rho = 100—250\text{g/L}$  的范围内,该菌均可生长。最适生长的  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 160(图 7)。在高盐度的培养基中,菌株的形态仍然比较均一,细胞悬液为鲜艳的玫瑰红色,与紫色非硫细菌种类所具有的颜色有明显的不同。这表明 Y 菌株系极端嗜盐菌。

## 3 讨论

从鉴定结果分析,Y 菌株细胞为杆状。具单个极生鞭毛。二分裂繁殖。细胞含有特征性细菌叶绿素 a。光合内膜系统为片层堆积并与细胞质膜相连。最主要的特征是 Y 菌株可在光照厌氧条件下依赖盐碱环境氧化硫化物产生硫粒沉积于细胞外。从已经鉴定的细胞形态,超微结构,鞭毛,繁殖方式,光合色素,尤其是细胞的嗜盐嗜碱,产细胞外硫粒等特征分析,依据《伯杰氏系统细菌学手册》第九版和有关文献,Y 菌株应归属于嗜盐红螺菌属(*Halorhodospira*)。

1996 年,Imhoff 等依据 16SrDNA 序列分析的结果将极端嗜盐种类从外硫红螺菌科(Ectothiorhodospiraceae)中移出单独建立一新属 *Halorhodospira*。目前, *Halorhodospira* 属的主要特征是所有种类可在含有硫的极端盐碱的环境中生长。革兰氏阴性,细胞为螺旋状或杆状,直径  $0.5—1.2\mu\text{m}$ ,具有双极生鞭毛,二分裂繁殖,光合内膜为片层堆积并与细胞质膜相连,光合色素为细菌叶绿素 a 或 b 和类胡萝卜素。在厌氧条件下,可以还原态的硫化物作为电子供体进行光自养生长,也可以利用一些简单的有机物进行光异养生长。硫化物被氧化为元素硫沉积于细胞外,也可进一步被氧化为硫酸盐。生长依赖于盐和碱的条件,对盐的最小需求量为 10%,一些种类可以生长在饱和盐度的水体中。不需要生长因子。该属表型特征与 *Ectothiorhodospiria* 属的主要区别是对盐的需求, *Ectothiorhodospiria* 属的种类一般在低于 10% 的盐度中生长,只有新建种类 *E. haloalkaliphila* 耐盐并可在 15% 的盐中生长,但最适盐度  $\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$  为 50。*Halorhodospira* 属现包括 *H. halophila*、*H. halochloris* 和 *H. abdelmalekii* 3 个种,其中 *H. halochloris* 和 *H. abdelmalekii* 最适盐度  $\rho$  为  $150\text{g/L}$ ,细胞革兰氏阴性,为明显的螺旋状,分别具有双极生和极簇生鞭毛,细胞含有细菌叶绿素 B 而使培养液呈现绿色。*H. halophila* 菌株最适盐度范围为  $\rho = 100—250\text{g/L}$ ,与本文报道的 Y 菌株很相似,但 *H. halophila* 菌株细胞为明显的螺旋状且具有双极生鞭毛,DNA 中 G + C 含量为 68.4 mol %,且为严格厌氧菌。根据已鉴定特征与资料报道的所有种类特征相比较有明显的区别,其分类地位有待于进一步的研究。Y 菌株嗜盐嗜碱、具有固氮和产氢能力并可代谢多种有机物的特性,其进一步开发利用具有重要的理论和应用价值。

**参考文献:**

- [1] Imhoff J F, Petri R, Suling J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the  $\alpha$ -Proteobacteria [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, **48**: 793—798
- [2] 李勤生, 卫翔, 王若雪, 等. 光合细菌 H<sub>3</sub> 菌株的分离及其生物学特性研究 [J]. 水生生物学报, 1999, **23**: 18—23
- [3] 史清亮, 杨素萍. PSB 生物肥料的研制及其应用效果 [A]. 微生物肥料的生产应用及其发展—'95 全国微生物肥料专业会议论文集 [C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 100—103
- [4] Imhoff J F, Truper H G. *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov; a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophylla b [J]. *Arch Microbiol*, 1977, **114**: 115—121
- [5] Pfennig N, Truper H G. Isolation of Members of the Families Chromatiaceae and Chlorobiaceae [A]. In: Starr M P et al. *The Prokaryotes* [M]. Berlin: Springer-verlag, 1981, 282—284
- [6] Pfennig N. *Rhodopseudomonas acidophila*, a new species of the budding purple nonsulfur bacteria [J]. *J Bacteriol*, 1969, **99**: 591—602
- [7] 杨素萍, 张肇铭, 赵春贵. 绿硫红假单胞菌和绿色红假单胞菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 1995, **35**: 91—96

## THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *HALORHODOSPIRA* SP., A HALOPHILIC AND ALKALIPHILIC PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM

YANG Su-ping<sup>1,2</sup>, ZHAO Chun-gui<sup>2</sup>, QU Yin-bo<sup>1</sup> and QIAN Xin-min<sup>1</sup>

(1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100;

2 Department of Life Sciences, Key Laboratory of Bioengineer, Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract:** Strain Y has been screened from salt flats of Yuncheng Saline lant in Shanxi Province. According to the 《Berger's Manual of Determinative Bacteriology》 ninth edition (1994), 《Berger's Manual of Systematic Bacteriology》 third volume (1989) and some related materials, the pure culture the morphological, salinity test, physiological and biochemical properties, should be classified into the genus *Halorhodospira*. Growth of strain Y was depended on 16 percent sodium chloride and pH 9.0 alkaline condition. Cell was rod shaped, 0.4—0.5  $\mu\text{m}$  wide and 0.9—1.5  $\mu\text{m}$  long. Photosynthetic pigment is bacteriochlorophylla a. Color of cell suspensions is rose red under anaerobically with incandescent lamp. Multiplication is by binary fission. Internal photosynthetic membranes are present as lamellar stacks that are continuous with the cytoplasmic membrane. Under anaerobic condition, it is capable of growing photoautotrophically with reduced sulfur compounds as sole electron donors, sulfide is oxidized to element sulfur, which is deposited outside the cells, and may be further oxidized to sulfate. It is also able to grow photoheterotrophically with many simple organic compounds. On the basis of its optimum NaCl requirements, pH, photosynthetic pigment and the mode of flagellum, the strain is significantly different from all known species of *Halorhodospira*, this strain's taxonomic status will further be discussed.

**Key words:** Photosynthetic bacteria; *Halorhodospira*; Halophilic; Alkaliphilic