

光合细菌 H_3 菌株的分离及其 生物学特性研究 *

李勤生 卫 翔 ** 王若雪 ** 孙晓白

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

摘要 H_3 菌株系由盐田微生物垫中分离获得的光合细菌株。革兰氏阴性杆菌, $0.5-0.7 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$, 在培养条件改变时呈多形态, 其膨大细胞可达 $4.0-7.0 \mu\text{m}$ 。单根极生鞭毛, 二均分裂。菌落及液体培养物呈深紫红色。菌体蛋白质含量约 50%, 各种必需氨基酸齐全, 并含有丰富的细菌叶绿素 a 和类胡萝卜素。 H_3 菌株在光照和黑暗条件下均可生长, 能利用多种有机和无机碳、氮源, 并能固 N_2 。在含 0.5—7.0% NaCl 培养基中均可生长。但光照、盐浓度、温度、pH 和通气等条件对其生长量有明显的影响。作者对其分类地位和应用潜力作了讨论。

关键词 光合细菌, 微生物垫, 生物学特性

光合细菌是一类能利用光能、具有复杂代谢功能的微生物。根据伯杰系统细菌学分类手册记载, 仅不产氧光合细菌就包括有 27 属、66 种^[1]。近几年来陆续有新的种、属报道^[2-5]。它们分布在淡水、海水、极地或温泉(包括高热水体), 以及高盐等不同生境中。它们能利用的基质也是多种多样的, 可营自养、异养或兼性营养; 亦有厌氧、好氧和兼性厌氧类型。利用光合细菌研究光合作用反应中心三维结构取得的成果, 荣获了 1988 年度诺贝尔奖金^[6]; 在阐明生物固氮分子调控机理方面也取得了重大进展^[7]。此外, 光合细菌在开发新产品、新能源和环境治理等应用领域也有广阔前景^[8-10]。因此, 光合细菌是重要的理论研究对象, 也是值得深入开发的宝贵微生物资源。

H_3 菌株是作者从我国海南岛一盐田微生物垫中分离获得的光合细菌。对其生物学特性作了较详细的研究, 为深入进行基础和应用研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株分离方法与培养条件 由盐田微生物垫中采样, 用 Nisson & Dundas 培养基^[11]富集培养; 经 RCVBN 培养基纯化^[12]。采用液体稀释法和琼脂法相结合的方法, 反复挑取

* 农业部八五重点科研合同项目, 编号 85-91060104。

本文承武汉大学卫扬保教授审阅、本所陈国胜协助氨基酸分析, 谨致谢忱。

** 系武汉大学实习生, 先后参与部分实验。

1994-08-01 收到。1998-10-08 修回。

单菌落以获得纯培养物。于30℃、日光灯光照、微好氧条件下培养3—7d。

1.2 微好氧条件的建立 采用的培养容器(培养瓶或试管)中注入液体培养基,仅留极小空隙以便混匀内容物,外加橡皮塞阻断外来空气。

1.3 菌落及菌体形态学观察 以琼脂柱中生长的菌落形态记述;菌体形态以光学显微镜与电子显微镜观察相结合。电镜观察样品均负染色。电镜型号为H300日立透射电镜。

1.4 细菌细胞氨基酸分析 样品处理PITC衍生,采用Waters PICO TAGTM氨基酸分析系统测定。

1.5 细胞色素光谱吸收峰值测定 培养物离心后洗涤,将细胞再悬浮于60%蔗糖溶液中,采用日本岛津UV-3000双光束分光光度计扫描,波长范围为320—900nm。

1.6 生长量的测定 为比较不同培养条件下(包括培养基、光照、温度、pH、盐度等)培养物生长量的差别,采用722型分光光度计检测培养物OD值(660nm)。

1.7 对碳、氮源的利用 以Nisson & Dundas和RCVBN两种培养基为基础,以1%浓度的不同碳、氮源取代其中相应成份,培养3—7d,观察生长情况。

2 结果

2.1 H₃菌株菌落形态

在RCVBN琼脂柱中,菌落呈深紫红-紫色,大小从针尖状至直径1mm,质软,边缘整齐,圆形或近似圆形,在琼脂浓度较低时,可见菌落边缘有向外扩展生长的现象。

2.2 菌体形态

经反复分离纯化后的H₃培养物在RCVBN或Nisson & Dundas培养基中,其形态与培养条件有明显的关系。在盐度较低的培养基中(如1.5%NaCl浓度的RCVBN或Nisson & Dundas培养基)形态比较均一,呈杆状,或略有弯曲杆状,两端钝圆或略膨大,二均分裂,单根极生鞭毛,菌体约0.5×1.45μm左右(图版I:1、3、4),培养较长时间后,菌体可聚集成团(图版I:5)或呈条索状(图版I:6)。当培养基中盐度增高至3.0—3.6%时,出现膨大细胞,呈不规范椭圆或两端尖小、中间膨大的菱形细胞(图版I:2)。细胞内出现大空泡。菌体可增大至1.0—4.3×1.8—7.0μm;当盐度达5%时,细胞形态更为多样,有球状、椭圆、棒状、不规则膨大等形态。革兰氏染色阴性。

2.3 细胞氨基酸组成及含量分析

三种不同配方培养基中收获的H₃菌株细胞氨基酸分析结果表明,每100g样品中氨基酸含量在43.4—49.0%。各种必需氨基酸齐全(表1)。

2.4 细胞色素光谱吸收峰值测定

结果表明H₃菌株具有细胞叶绿素a,其光谱吸收峰值为384、527、590、680、805、830nm。此外,还发现H₃菌株有三种类胡萝卜素和一种未知色素将另文报道。

2.5 培养条件对H₃菌株生长量的影响

2.5.1 不同培养基中H₃菌株生长量的比较 比较了6种不同培养基中H₃菌株培养物的OD值(660nm)。其中以PSB-51号培养基最佳;Ni-6、R-3、N-2、H-4等培养基次之;以PSB-6生长最差,而NH-4培养基中几乎不生长。

2.5.2 光照条件对H₃菌株生长量的影响 将同批培养物分别置于日光灯和白炽灯光照

表1 H_3 菌株细胞氨基酸分析Tab.1 Composition of amino acids in cells of strain H_3 . (g/100g)

氨基酸名称 Name of amino acid	培养基 Ni-6 Medium Ni-6	培养基 R-3 Medium R-3	培养基 H-4 Medium H-4
天门冬氨酸 Asp	4.5463	3.9460	4.3788
谷氨酸 Glu	7.4744	8.5653	8.4928
丝氨酸 Ser	1.4916	1.4313	1.5752
甘氨酸 Gly	2.7238	2.4999	2.9001
组氨酸 His	1.1926	0.9728	1.0848
精氨酸 Arg	4.3813	2.9564	3.5453
苏氨酸 Thr	2.3035	1.9189	2.3665
丙氨酸 Ala	4.1533	3.4860	4.1711
脯氨酸 Pro	2.1833	1.8106	2.1352
酪氨酸 Typ	1.7599	1.5703	1.8062
缬氨酸 Val	3.7707	3.1802	3.8150
蛋氨酸 Met	1.4548	1.3264	1.4155
半胱氨酸 Cys	0.0289	0.0311	0.0359
异亮氨酸 Ile	2.4481	2.1215	2.5340
亮氨酸 Leu	3.9949	3.4554	4.0549
苯丙氨酸 Phe	2.6481	2.0780	2.6775
赖氨酸 Lys	2.0173	2.0183	2.0508

下培养,一般日光灯光照均优于白炽灯。在不同培养基中光源产生的影响程度不同。在室内自然光照下可以生长,但不及人工光照下生长丰厚。在黑暗中生长量少,但由黑暗条件下转至光照下继续培养时,生长良好。

2.5.3 H_3 菌株生长的 pH 范围 在中性和偏碱性条件下生长最好。其生长的 pH 范围为 5—10 之间,培养基 pH 低于 5 或等于 10 均难以生长。值得注意的是在不同培养基中其最适 pH 范围有所不同。在 R-36 培养基中, H_3 菌株以 pH7.0 最好;而在 Ni-6 培养基中 pH8—9 之间生长量最高。

检测 H_3 菌株培养液起始和最终 pH 值发现,在 R-3 培养基在中性以下偏酸范围内,培养 120h 后, pH 值均上升 0.1—0.51;凡起始 pH 在 7.0 以上碱性范围者,均有不同程度下降,最低下降 0.33pH 值,最高者达 0.71pH 值。在 Ni-36 培养基中则更为显著,最大变化幅度达 1.27pH 值。凡接近中性者变化小。如起始 pH 为 7.0 者,最终 pH 为 6.88。详见表 2。继续观察,发现起始 pH 为 5.03 者经过一月后, pH 上升至 7.55;原为 pH10.02 者,后下降至 8.22。这种变化均明显地趋向其最适 pH 范围。由此可见此菌株具有有效的调节功能(表 2)。

2.5.4 温度 比较 H_3 菌株在 20℃、25℃ 和 30℃ 温度下培养 96h 的生长量,发现以 30℃ 条件下生长量最高,25℃ 时约为它的 95.2%;20℃ 则仅相当于 30℃ 条件下生长量的 51.8%。

2.5.5 盐度与 H_3 菌株生长量的关系 当培养基中无 NaCl 时, H_3 菌株不生长,表明其属于需盐细菌。在 0.5—7.0% NaCl 浓度范围内, H_3 菌株均可生长。在含 1.0% NaCl 培养基中生长最佳,以其生长量净增值为基数,在含 0.5、1.5、3.6、5.0、7.0% NaCl 培养基中培养时的净增值分别为它的 70.1%、87.8%、84.6%、62.6% 和 37.1%。

表2 H₃菌株培养液起始和最终pH变化与生长量的检测结果Tab.2 Initial and final pH in medium in strain H₃ culture and abundance.

R-3				Ni-6							
起始		120h		变化幅度		起始		120h		变化幅度	
pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD
5.01	0.026	4.80	0.037	-0.21	+0.011	5.03	0.065	5.52	0.375	+0.49	+0.310
5.50	0.024	5.60	0.427	+0.10	+0.423	5.51	0.064	6.16	0.532	+0.65	+0.468
6.02	0.026	6.53	0.467	+0.51	+0.441	6.08	0.077	6.79	1.407	+0.71	+1.330
6.50	0.025	6.77	0.449	+0.22	+0.424	6.50	0.065	6.84	1.226	+0.34	+1.161
6.71	0.036	6.94	0.898	+0.23	+0.362	7.00	0.056	6.88	1.109	-0.12	+1.053
7.00	0.043	7.06	0.577	+0.06	+0.534	7.50	0.060	6.98	1.270	-0.52	+1.210
7.50	0.081	7.17	0.435	-0.33	+0.354	7.99	0.051	7.03	1.339	-0.96	+1.288
7.99	0.088	7.28	0.586	-0.71	+0.498	8.55	0.056	7.56	1.360	-1.01	+1.304
8.50	0.093	7.94	0.455	-0.56	+0.362	8.98	0.060	7.93	1.376	-1.05	+1.316
8.99	0.083	8.37	0.370	-0.62	+0.277	9.50	0.086	8.23	1.065	-1.27	+0.979
9.50	0.064	8.83	0.145	-0.67	+0.081	10.02	0.092	9.33	0.144	-0.69	+0.052
10.00	0.056	9.49	0.061	-0.51	+0.005						

* “+”为pH或OD值上升;“-”为pH或OD值下降

2.5.6 H₃菌株对不同碳、氮源的利用能力 该菌株可利用多种有机和无机碳、氮源,并可固N₂,其中包括对苯二酚和明胶等物质,不仅表明此菌株对基质利用的广泛性,同时也显示了它的应用潜力(表3)。

表3 H₃菌株对碳、氮源的利用能力Tab. 3 Utilization ability of C and N source in strain H₃.

碳、氮源名称 Name of C or N source	生长情况 Abundance	碳、氮源名称 Name of C or N source	生长情况 Abundance
N ₂	+	苯甲酸 Benzoic acid	+
NaNO ₃	++	丙二酸 Malonic acid	+++
NH ₄ NO ₃	++++	乙酸 Acetic acid	+++
NH ₄ Cl	++++	乙醇 Alcohol	+++
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++	DL.苹果酸 DL. malate	++++
草酸铵 Ammonium oxalate	+++	对苯二酚 Paraphenylenediphenol	++
柠檬酸铵 Ammonium citrate	+	酪蛋白水解物 Casein hydrolysate	+
磷酸氢二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄	+	蛋白胨 Peptone	++++
尿素 Urea	++	纤维素 Cellulose	-
明胶 Gelatin	++++		

注: +生长, ++生长较好, +++生长良好, ++++生长丰厚, -不生长

2.5.7 通气条件对H₃菌株生长量的影响 在振荡培养条件下,H₃菌株可以生长,但生长量明显低于静置、微氧条件下的生长量,而且色素合成能力丧失或降低,导致培养物呈灰白色或微粉红色。

3 讨论

3.1 根据菌株形态、色素、培养特性和对有机或无机碳、氮源的利用能力等特征, H_3 菌株与着色菌科 (Chromatiaceae)、着色菌属 (Chromatium) 的某些特点相似。按伯杰氏系统细菌学分类手册记载, 着色菌属包括 10 个种。其中奥氏着色菌 (Chromatium okenii)、韦氏着色菌 (C. weissei)、沃氏着色菌 (C. warmingii) 和巴氏着色菌 (C. buderii) 四种为大细胞种类, 细胞直径均大于 $3.5-4.5\mu\text{m}$, 而且要求维生素 B_{12} 生长因子。其余 6 种细胞直径在 $1.0-2.0\mu\text{m}$ 之间, 以细着色菌 (C. gracile) 细胞直径最小, 为 $1.0\mu\text{m}$, 生长要求 $2.0\% \text{NaCl}$, 但其培养物为红褐色。紫色着色菌 (C. purpuratum) 培养物呈紫红色, 生长需盐, 不要求生长因子, 与 H_3 菌株相似, 但其细胞直径为 $1.2-1.7\mu\text{m}$ 。 H_3 菌株与此属中的 10 个种比较均有不同程度的差别, 其分类地位值得进一步研究。

3.2 H_3 菌株细胞蛋白质含量约 50% 左右, 其中含有人和动物必需的氨基酸量高且种类齐全。值得注意的是不同培养基质对其氨基酸含量似有影响, 三种培养物检测结果相距 1—6%; 亦可能因光合细菌代谢途径复杂, 基质对其最终产物的形成和积累产生相应的影响, 深入研究其生理代谢特性, 无疑具有理论意义和应用价值。 H_3 菌株含有丰富天然色素, 如 BChl a 和类胡萝卜素, 有可能开发新的产品。在 H_3 菌株可利用的有机和无机物质中还包括有对苯二酚类物质, 在培养过程中对环境 pH 有相当的调节能力, 这些特性显示其在环境治理和毒物降解方面的应用潜力。

3.3 本文报道的 H_3 菌株对培养条件的要求及适应范围, 比较温度、pH、光照和通气条件、盐浓度及不同培养基质对其生长量的影响, 为进一步研究提供了科学依据。

参 考 文 献

- [1] Staley J. T. & Holt J. G., 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, Williams & Wilkins, Baltimore London
- [2] Mack E. E., Mandelco L., Woese C. R., Madigan M. T., 1993. *Rhodospirillum sodomense*, sp. nov., a Dead Sea *Rhodospirillum* species. *Arch. Microbiol.*, **160**:363—371
- [3] Overmann J., Fischer U., Pfening N., 1992. A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments *Thiorhodovirbrio Winogradskyi* gen. nov. and sp. nov.. *Arch. Microbiol.*, **157**(4):329—335
- [4] Oren A., Kessel M., Stackebradt E., 1989. *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligately anaerobic moderately halophilic purple sulfur bacterium from a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. *Arch. Microbiol.*, **151**:524—529
- [5] Stadtward-Dermchick, Turner R., Gest F. R. H., 1990. *Rhodopseudomonas cryptolatic* sp. nov., a new thermotolerant species of budding phototrophic purple bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**(1—2):117—122
- [6] 叶济宁, 1989. 光合作用研究的第六次获奖. 科学, **4**(2):140—142
- [7] 吴永强, 宋鸿遇, 1991. 光合细菌固氮分子生物学研究进展. 植物生理学通讯, **27**(3):161—166
- [8] 李勤生、谭德清、王业勤, 1990. DL.1 微生物饲料添加剂对养殖鱼类的促长作用. 水生生物学报, **14**(4):368—371
- [9] 胡贻智、谭德清、王后乐、谢家桑、唐会元、郭右津, 1991. 罗氏沼虾的养殖推广试验洪湖水体生物生产力综合开发及湖泊生态环境优化研究, 北京: 海洋出版社, 113—116
- [10] 刘如林、丁虎欣、梁凤来、赵大健, 光合细菌及其应用. 北京: 中国农业技术出版社, 1991.
- [11] Nisson H. & Dundas I. D., 1984. *Rhodospirillum salinarum* sp. nov., a halophilic photosynthetic bacterium

isolated from a Portuguesse saltern. *Arch. Microbiol.*, **138**:251—156

[12] Weaver P. F. et al. 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.*, **105**:207—216

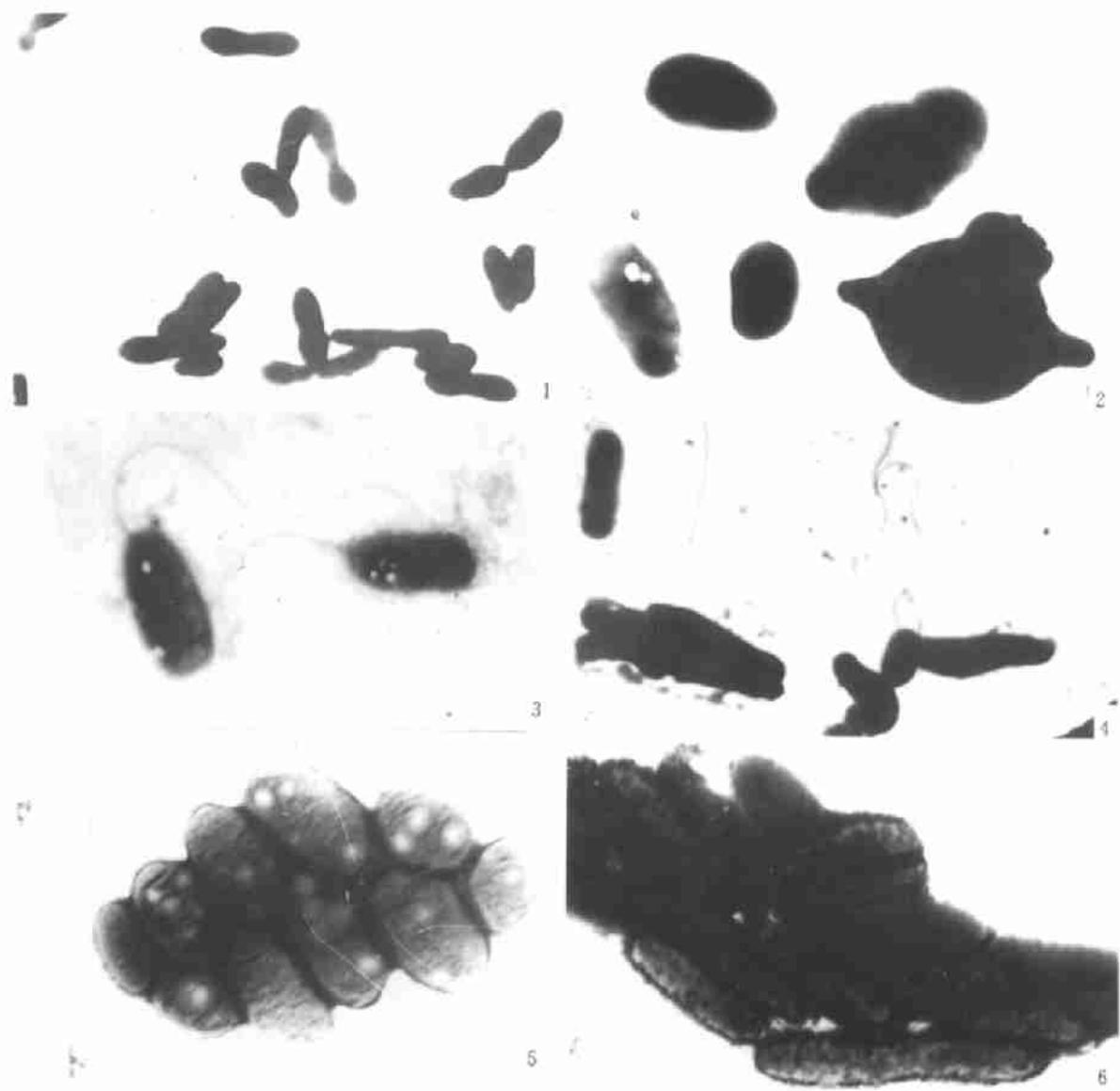
ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM STRAIN H₃

Li Qinsheng, Wei Xiang, Wang Ruoxue and Sun Xiaobai

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430072)

Abstract Photosynthetic bacterium strain H₃ was isolated from the microbial mat of a saltern in Hainan Province (China). It is a Gram-negative bacterium. The bacterial cells straight or slightly curved rod-shaped, 0.5—0.7μm wide, 1.5—2.5μm long, with monotrichiate polar flagellum, multiplication by binary fission. In different environmental or culture conditions, pleomorphic cells can be observed. The cells appear in spherical, ovoid, or club-shape, sometimes large swellings, spindle or rhombus-shaped cell form, the width and length may be 4.0×7.0μm. Under anaerobic or microaerobic conditions, the culture appears purplish-red with major pigments being Bchl a and carotenoids. The protein contains ca 50% in strain H₃ cells. Necessary amino acids for human and animal were included. Strain H₃ grows well in inorganic or organic substrate media containing 0.5—7.0% NaCl. Acetate, alcohol, malonic acid, bicarbonate, paraphenylene diphenol, nitrate, ammonium salt can be used as C or N source, VB₁₂ is not required for the growth. The optimum conditions for growth are: 30℃, pH7—8, 1.0% NaCl concentration, illumination 1700—2000Lux, under anaerobic or microaerobic. The strain's taxonomic status and applied potential were discussed.

Key words Photosynthetic bacterium, Microbial mat, Biological characteristics



1. H_3 菌株二均分裂细胞 $\times 8000$. Binary fission cells of H_3 strain. ($\times 8000$); 2. H_3 菌株多形态细胞 $\times 10000$. Pleiomorphic cells of H_3 strain. ($\times 10000$); 3—4. 单根极生鞭毛 $\times 10000$. H_3 strain cells with monotrichiate polar flagellum. ($\times 10000$); 5—6. 聚集状细胞 $\times 13400$. Aggregated cells of H_3 strain. ($\times 13400$).