

研究报告

产氢紫色非硫光合细菌的分离与筛选

刘双江 杨惠芳 周培瑾

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要 从不同来源的样品中分离到 5 株紫色非硫光合细菌,从中筛选出 2 株产氢量较高的菌株 D 和菌株 H。对其产氢动力学研究表明,在含有 20mmol/L 谷氨酸钠和 50mmol/L D,L-苹果酸培养基中,两株菌可连续稳定产氢 5-8d,其产氢速率分别为 10.18 和 20.61 $\mu\text{l/h} \cdot \text{mg}$ 细胞干重。

关键词 光合细菌;氢能;光照放氢

早在 1949 年,Gest 和 Kamen^[1]发现了深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)在厌氧光照条件下,能利用谷氨酸或天冬氨酸做氮源,以有机酸如丙酮酸、苹果酸为底物进行光照放氢。作为一种生理性状,光合细菌的光照放氢已被广泛研究,并被证明普遍存在于光合细菌中^[2-4]。

进入 70 年代以来,全球性能源危机导致人们寻求新的能源物质,氢作为一种无污染、可再生的理想能源而被开发利用。对光合细菌的产氢现象开始了应用技术方面的研究,一方面寻找产氢量高的光合细菌(如日本的 Miyake 等人^[5]筛选到的产氢紫色非硫光合细菌平均产氢速率为 18.4 $\mu\text{l/h} \cdot \text{mg}$ 细胞干重),另一方面则致力于产氢工艺的研究^[6-8],从而使光合细菌放氢技术不断向实用化阶段发展。

本工作从不同来源的样品中分离出 5 株紫色非硫光合细菌,从中筛选出 2 株产氢活性较高的菌株,并对其产氢动力学进行了研究。

材料与方法

(一) 样品来源

样品取自北京地区的湖泊和两个用于处理有机污水的生物反应器。反应器出水略呈红色,可用显微镜观察到有光合细菌存在。

(二) 光合细菌的富集、分离与鉴定

1. 培养基组成:普通培养基配方参照文献[9],在其中加入 10mmol/L D,L-苹果酸做碳

源。富集培养基中加入少量 NH_4Cl (0.15g $\text{NH}_4\text{Cl/L}$)。产氢培养基中加入 10mmol/L L-谷氨酸钠做氮源,加入 50mmol/L D,L-苹果酸钠作为碳源和电子供体。

2. 样品的富集:取自湖泊的样品首先进行富集培养,在 50ml 厌氧瓶中加入 30ml 富集培养基,气相为 N_2 ,0.5 kg/cm^2 30min 杀菌后加入 1ml 样品进行富集培养。取自反应器的样品不经过富集,可直接分离其中的光合细菌。

3. 光合细菌的分离与鉴定:光合细菌的分离采用琼脂摇和培养方法(Agar Shake Culture Technique)^[8]。对分离的 5 株光合细菌进行初步鉴定,方法参照文献[8]。

(三) 培养条件

培养温度为 $30 \pm 2 \text{C}$,40W 或 60W 白炽灯做光照光源。

(四) 测定方法

1. 氢的测定:采用 GC-7 型气相色谱仪测定, N_2 为载气,进样量 400 μl 。以外标法计算氢含量。

2. 光合细菌产氢的测定:在自制的装置中测定。方法是:取一个 20ml 规格的注射器,将注射器塞顶端去掉,口磨平,标定容积,倒置于注射器筒内(图 1)。在注射器筒中加入 30ml 产氢培养基,接种 5ml 培养物。注射器针口处用橡皮帽封住。定时记录产气量(1atm,30C 条件下体积)。经色谱多次测定,采用这种方法收集

的气体中90%以上都是氢气,其中CO₂可以忽略。

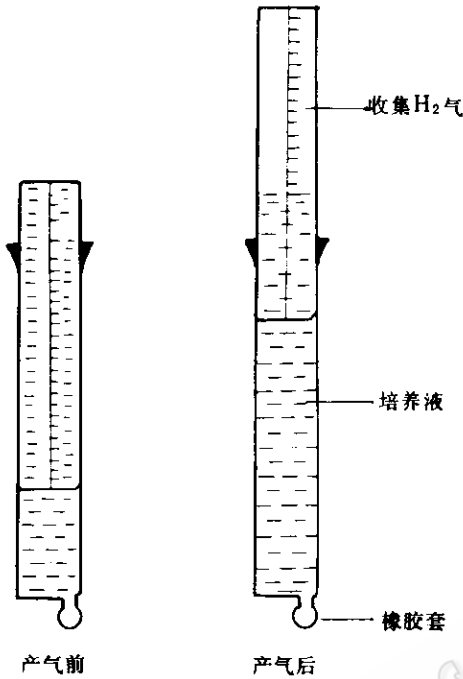


图1 光合细菌产氢量的测定装置(示意图)

产氢速率是以菌株稳定产氢期间的产氢量

和培养结束时的细胞量为基础计算得出。

3. 细胞干重的测定:培养结束时,培养液经5000g×10min离心收集细胞,用20ml蒸馏水冲一次,离心,弃掉上清液,把细胞转入小烧杯内,85℃,至恒重,计算细胞干重。接种的细胞量可忽略不计。

4. 活菌体先吸收峰波长值的测定:培养液5000g×10min离心收集细胞,用60%(W/V)蔗糖水溶液重新悬浮细胞后,用日立557型光谱仪在350—900nm波长范围内对样品扫描,记录其光吸收峰波长值。

5. 光合膜结构的观察:经5000g×10min离心收集的光合细菌细胞,通过干燥、脱水、包埋等处理后,制成超薄切片,用透射电镜观察细胞内光合膜系统的结构。

结 果

(一) 光合细菌的生物学特性

从采集的样品中共分离到5株紫色非硫光合细菌,其中菌株A和菌株H分离自湖泊,菌株D、E和N分离自反应器。

1.5株光合细菌的生物学特性与红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)和红杆菌属(*Rhodobacter*)特征的比较(表1):

表1 5株光合细菌的某些生物学特性与Rdp.和Rhb.属特征的比较

项 目	D	E	H	Rdp.	A	N	Rdb.
培养液颜色	红	红	红	红	橙至红	橙至红	橙至红
细胞形状*	R	R	R	R	O,SB	O,SB	O,SB
细胞直径(μm)	0.5—0.7	0.5—0.6	0.5—0.8	0.6—2.5	0.6—0.7	0.7—0.8	0.5—1.2
运动性	+	—	+	+或—	—	—	+或—
含Bchl.种类**	a	a	a	a或b	a	a	a

*:“R”杆状,“O”卵圆状,“SB”短杆状

** :Bchl. a为细菌叶绿素a,Bchl. b为细胞叶绿素b

为了便于看清分离到的5株菌的分类位置,表1中列出了Rhp.和Rhb.两属的特征,从表1中看出分离到的5株光合细菌均为光能异养型菌,除菌株E在含有Na₂S无机培养基(加入0.01%酵母膏)中有一定生长外,其他4株

菌均无明显生长。5株菌可分为两组,菌株D、E和H的细胞培养液呈红色,细胞为不规则杆状,与Rhp.属的细菌特征相近。菌株A和N的细胞培养液颜色从橙黄到红色,培养液早期多为橙黄色,晚期为红色,细胞为卵圆到短杆状,

这些特征与 Rhb. 属的细菌的特征相近。

2. 光吸收峰波长值: 光合细菌细胞内含有细菌叶绿素和其它色素, 因此光合细菌的细胞具有特征性的光吸收图谱(图 2), 如含有 Bchl. a 的光合细菌细胞的最大吸收峰波长在 830—

890nm, 从菌株 H 细胞的光吸收图谱(图 2)和 5 株光合细菌的光吸收峰波长值(表 2)看出, 菌株 D、E、H、A 和 N 分别在 870、859、870、848 和 849nm 处有吸收峰, 说明在它们的细胞内都含有 Bchl. a。

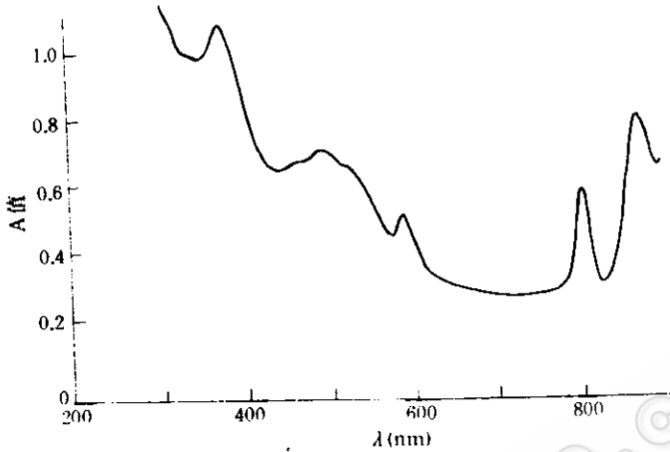


图 2 光合细菌 H 株细胞的光吸收图谱

表 2 光合细菌细胞的光吸收峰波长值

菌株	Anm					
D	870	800	585	520*	484	456*
E	859	802	588	—	490	374
H	870	802	590	520*	490	460*
A	848	799	584	508*	480	448*
N	849	800	583	508*	476	448*

* 指肩峰, “—”此处无明显吸收峰

3. 光合膜系统的特征: 电镜观察到 5 株光合细菌的光合膜 (Photosynthetic membrane system) 有两种类型(图 3), 菌株 D、E 和 H 的光合膜呈层状 (Lamellar type)^[9], 位于质膜下; 菌株 A 和 N 的光合膜呈泡囊状 (Vesicular type)^[10], 分布于整个胞质中。

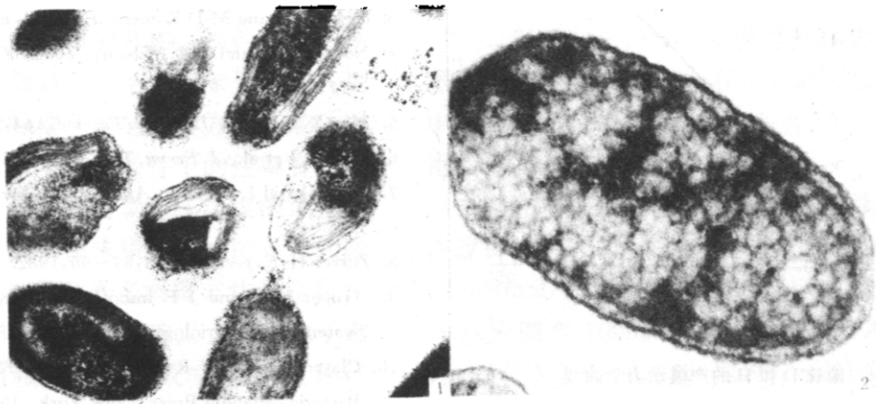


图 3 两种类型的光合膜系统的特征

(1) 菌株 D(30,000X) (2) 菌株 A(60,000X)

根据上述 5 株光合细菌的生物学特性,初步鉴定为^[11];菌株 D、E 和 H 可归属于红假单胞菌属(Rhp.),菌株 A 和 N 则可归属于红杆菌属(Rhb.).关于 5 株光合细菌的其它详细特征还在研究之中。

(二) 产氢光合细菌的筛选及产氢动力学

1. 产氢光合细菌的筛选:对 5 株光合细菌在产氢培养基中的产氢情况进行筛选(表 3)。从表 3 中可以看到,5 株光合细菌中除菌株 E 外,其他 4 株菌均能以 D,L-苹果酸为底物在厌氧光照条件下放氢,并以菌株 D 和 H 的放氢量最高,菌株 A 和 N 也能放氢,但放氢量较低。菌株 A 和 N 的细胞产量较菌株 D 和 H 要高。

表 3 5 株光合细菌的产氢量和细胞产量

菌株	2 天后产氢(ml)	4 天后产氢(ml)	细胞干重(mg)
D	4	12.5	11.5
E	0	0	12.7
H	7.5	25.0	11.5
A	7.1	9.0	18.4
N	0.2	2.5	15.3

2. 菌株 D、H 的产氢动力学:菌株 D 和 H 在产氢培养基中随培养时间的延长累积产氢量逐渐增加(图 4)。从图 4 中可以看到,光合细菌

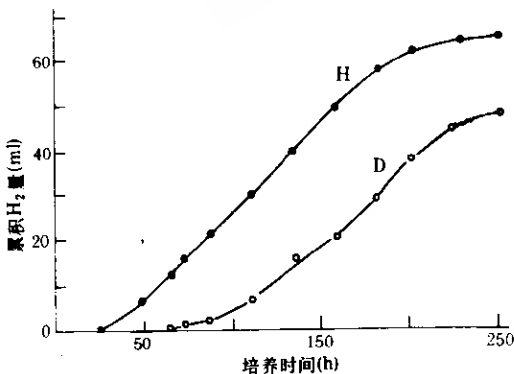


图 4 菌株 D 和 H 的产氢动力学曲线

生长细胞放氢是在培养几十个小时后才开始的,放氢速率在相当一段时间内保持不变,菌株 H 和 D 分别在培养的第 48-180h 和第 100-

200h 放氢速率基本一致,累计产氢量在不断增加(图 4)。根据图 4 中两条曲线的直线区段的斜率和培养结束时细胞的产量(菌株 D 和 H 的细胞干重分别为 14.7 和 18.2mg),计算出两菌株放氢速率分别为 10.18 和 20.16 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg}$ 细胞干重。

讨 论

参与光合细菌产氢的酶有两种,即氢酶和固氮酶^[11]。光合细菌在厌氧光照条件下的放氢被认为是由固氮酶催化的一种代谢反应,因此固氮酶活性高低及其调控情况,直接关系到光合细菌放氢活性的高低。 NH_4^+ 是固氮酶的反馈抑制剂, N_2 是固氮酶的底物同时又是放氢反应的竞争性抑制剂^[10,12]。Miyake 等人^[13]利用改变培养基中氮源(NH_4^+ 或 N_2)及培养条件(好氧黑暗及厌氧光照)的方法,富集分离到的光合细菌平均产氢速率为 18.4 $\mu\text{l}/\text{h} \cdot \text{mg}$ 细胞干重。在我们的富集筛选条件下,得到两株产氢速率较高的菌株,其产氢速率分别为 10.18 和 20.61 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg}$ 细胞干重,这说明我们选用的富集方法是有效的。

参 考 文 献

1. Gest H and M D Kamen; *Science*, **109**: 558-559, 1949.
2. Hillmer P and H Gest; *J. Bact.*, **129**: 724-739, 1977.
3. Siegel J M and M D Kamen; *J. Bact.*, **61**: 215-228, 195.
4. Newton J W and P W Wilson; *J. Microbiol. Serol.*, **19**: 71-77, 1953.
5. Mao X Y et al.; *J. Fermt. Technol.*, **64**: 245-249, 1986.
6. Miyake J et al.; *J. Fermt. Technol.*, **62**: 531-535, 1984.
7. Buranakarl L F et al.; *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 3339-41, 1985.
8. Zurrer H; *Experientia*, **38**: 64-66, 1982.
9. Truper H G and J F Imhoff; In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1658-1682, 1984.
10. Clayton R and W R Siström (eds'); *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York, 1978.
11. 吴永强等; *微生物学通报*, **18**(2): 71-74, 1991.
12. Ormerod J G et al.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**: 449-463, 1961.

(1992-10-30 收稿)