

一株紫色非硫光合细菌的分离鉴定和培养特性研究

林燕玲, 刘杰凤*, 周天, 陈俊任, 李婷, 丘盛情 (广东石油化工学院, 广东茂名 525000)

摘要 [目的]为了获得功能光合细菌新菌源。[方法]从茂名市郊区池塘底泥样中分离、纯化得到一株紫色非硫光合细菌, 编号为 GB-1。根据菌株的形态、细胞色素光吸收特征及生理生化分析, 对分离菌 GB-1 进行鉴定, 并且研究该菌的培养特性。[结果]经初步鉴定, 该菌为沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)。该菌的最适生长条件为: 以小分子有机酸为碳源, pH 8~9, 32~35℃, NaCl 浓度小于 1%, 白炽灯光照微氧。[结论]该菌能耐受浓度 5% NaCl, 培养 7d 后 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化率分别达到 57.71% 和 47.45%, 在水质净化方面显示较好的应用前景。

关键词 紫色非硫细菌; 光合细菌; 沼泽红假单胞菌; 培养特性

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)17-005-04

Isolation, Identification and Cultural Character of a Strain of Purple Nonsulfur Photosynthetic Bacteria

LIN Yan-ling, LIU Jie-feng*, ZHOU Tian et al (Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming, Guangdong 525000)

Abstract [Objective] The research aimed to obtain a new bacteria source of functional photosynthetic bacteria. [Method] A strain of purple nonsulfur photosynthetic bacteria GB-1 was isolated and purified from the sediment of fishpond in Maoming suburbs. The classification and identification of purple nonsulfur photosynthetic bacteria GB-1 was carried out by the observation of cell morphology, the cell coloring matter absorption spectrum determination and the study of physiological and biochemical characteristics. Meanwhile, the cultural character of the strain GB-1 was subsequently investigated. [Result] The strain GB-1 was identified as *Rhodopseudomonas palustris*. The optimum conditions for its growth were studied as follows: the best carbon source was a small molecule organic acid, growth temperature was 32-35℃, pH was 8-9, NaCl concentration was less than 1%, and the condition of illumination was incandescent light bulb and micro-aerobic. [Conclusion] Halotolerated ability of GB-1 were 5%. After the cultivation for 7 d, the removal rates for ammonia nitrogen and nitrite by the strain GB-1 was up to 57.71% and 47.45%, respectively. It appeared broad application prospects in the treatment of eutrophic water.

Key words Purple nonsulfur bacteria; Photosynthetic bacteria; *Rhodopseudomonas palustris*; Cultural character

紫色非硫细菌 (Purple nonsulfur bacteria) 是红螺菌科光合细菌的通称, 因富含不同类型的类胡萝卜素, 细胞培养液呈紫色、红色或棕色, 故称为紫色细菌。这类光合细菌曾被认为不能利用硫化物作为电子供体进行光合作用, 所以称它们为非硫紫色细菌。这类细菌的大多数尚可以利用低浓度的硫化物^[1-2]。

紫色非硫细菌在黑暗好氧、光照厌氧等条件下能以不同的代谢方式, 以有机物为光合作用的供氢体兼碳源, 因而具有较强的分解和去除有机物的生理特性, 其中不少种能耐受高浓度有机物, 故在处理高浓度有机废水中有着独特的优点和广泛的应用前途^[3-6]; 同时, 这类菌体细胞富含氨基酸种类全面的蛋白质、辅酶 Q 和 B 族维生素等多种生理活性物质, 因而成为增加动物营养、促进生长和增强防病抗病能力等功能的重要微生物资源^[7-10]。近年来, 由紫色非硫细菌固氮酶所催化的光合放氢研究也成为微生物制氢生产清洁能源的研究热点^[11-13]。

红螺菌科包括红螺菌属 (*Rhodospirillum*)、红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)、红微菌属 (*Rhodomicribium*) 3 个属, 其中红假单胞菌属用于净化水质、微生态制剂方面的研究较深入。笔者从茂名市郊池塘分离到一株具有高效去除 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的紫色非硫细菌, 鉴定其形态学和生理生化, 研究其生长特性, 为光合细菌的推广应用提供基础数据。

基金项目 广东省海洋渔业科技推广专项基金项目 (A201101B03, A201201C03); 国家级大学生科技创新训练项目 (234066)。
作者简介 林燕玲 (1992-), 女, 广东广州人, 本科生, 专业: 生物技术。
* 通讯作者, 教授, 硕士, 从事应用微生物方面的研究。
收稿日期 2015-04-21

1 材料与方法

1.1 材料 供试泥样采自茂名市周边养殖场。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基^[14]。组成为: NH_4Cl 1.0 g, NaHCO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.2 g, CH_3COONa 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 1.0 g, 生长因子 10 ml, 蒸馏水 980 ml, 微量元素液 10 ml, pH 7.0。其中, 生长因子组成为: 维生素 B1 0.01 mg、乙尼克丁酸 1.0 mg、对氨基苯甲酸 1.0 mg、生物素 0.01 mg, 蒸馏水定容至 100 ml; 将 NaHCO_3 配制成浓度 5% 水溶液; 微量元素液组成为: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005 mg, H_3BO_3 0.1 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.005 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, 蒸馏水定容至 100 ml。将以上 3 种溶液均经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.2.2 分离培养基。组成为: 乙酸钠 2.0 g、谷氨酸 2.0 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 NH_4Cl 1.0 g、 MgSO_4 0.5 g、NaCl 1.0 g, 用饮用井水定容至 1 000 ml, pH 7.0。固体培养基按 1.5% 添加琼脂。

1.2.3 液体培养基。组成为: 乙酸钠 2.0 g、酵母膏 2.0 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 NH_4Cl 1.0 g、 MgSO_4 0.5 g、NaCl 1.0 g, 用饮用井水定容至 1 000 ml, pH 7.0~7.4。

1.3 紫色非硫细菌的富集分离 将 20 ml 池塘底泥悬浮液加入 250 ml 透明塑料瓶中, 加满富集培养基, 液面注入液体石蜡, 隔绝空气, 置于 30℃、60 W 白炽灯光照下培养 10~15 d, 待液体培养物呈现红色, 转移至新配制的富集培养基中富集培养, 重复 2~3 次。取摇匀的富集培养物 100 μl , 涂布于培养皿中, 加入 20 ml 冷却至 40~45℃ 的固体分离培养基, 待培养基凝固后, 再在上面倒 55~60℃ 的溶化态固体石蜡,

制成固体石蜡双层培养平板^[15],置于强度为 60 W 的白炽灯下照射培养 10 d(30 ℃ ± 4 ℃)。揭去将覆盖在上层的固体石蜡,挑取粉红色至红色单菌落,倍比稀释后以同样方法进行纯化,纯种穿刺接种培养,保藏备用。

1.4 紫色非硫细菌的扩大培养 菌种活化容器为 150 mm × 15 mm 试管,扩培容器为 250 ml 透明塑料瓶(紫外线杀菌),培养容器装满灭菌液体培养基后,按 15% (10⁸ 个/ml, V/V)接种量接种,30 ℃、60 W 白炽灯光照下微氧培养,至培养液深红色, $OD_{660} \geq 1.5$ 。

1.5 生理特性试验 菌株的生理生化特性鉴定参照文献[16]所述方法进行。

1.6 测定方法 活菌体、离体光合色素吸收光谱检测参考文献[5]进行,即培养液经 5 000 r/min 离心得活菌体,用浓度 60% 蔗糖溶液制成菌体悬液;浓度 60% 蔗糖菌悬液以超声波破碎,得红色无细胞抽提液。2 种悬液均用 TU-180 型紫外-可见分光光度计扫描,波长范围 200 ~ 900 nm。

pH 用 pH S-3C 酸度计测定;NH₄⁺-N 用广东环凯微生物科技有限公司氨氮测定试剂盒测定;NO₂⁻-N 用盐酸萘乙二胺比色法测定。

1.7 紫色非硫光合细菌的鉴定 分离菌的培养特性、菌落及菌体形态、色素吸收光谱等分析参考文献[16-17]。

2 结果与分析

2.1 紫色非硫光合细菌的分离纯化 通过经典红螺菌培养基的固体石蜡双层培养平板法分离、纯化,得到多株光合细菌。通过扩大培养试验观察,发现其中一株菌的活性最佳,易于成活,故取该活性最好菌进行后续试验,并将该菌株命名为 GB-1。

在固体培养基中厌氧光照培养,GB-1 的菌落成圆形,表面低凸,边缘完整,湿润,有光泽,呈紫红色,半透明且易挑起(图 1)。在液体培养基中微好氧光照培养,GB-1 菌液为深红色,菌体均匀分布于菌液中。在无光照条件下培养,菌体虽能生长,但培养物几乎无色。



图 1 平板中的光合细菌菌落

2.2 紫色非硫光合细菌的鉴定

2.2.1 菌株的形态特征。 GB-1 为革兰氏阴性菌,菌体形态多样,多为杆状,稍有弯曲甚至弧状,大小不均,单个细菌的直径为(0.5 ~ 1.0) μm × (1.2 ~ 4.5) μm,有的长达 10 μm,没有形成芽孢,以形成分裂管的出芽方式繁殖,能明显见到呈哑铃状的菌体(图 2)。这些特征与沼泽红假单胞菌相似。

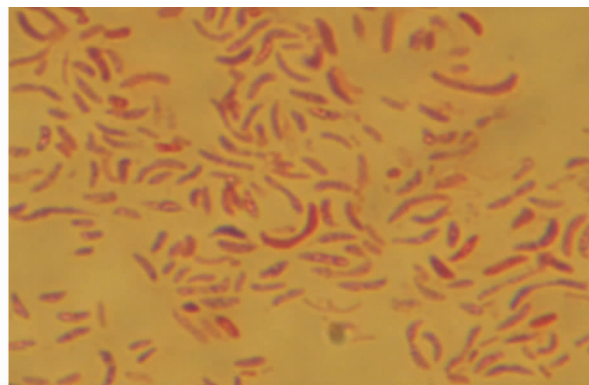


图 2 GB-1 菌体形态(1 000 ×)

2.2.2 活细胞及离体光合色素光吸收特征。 由图 3 可知,该菌含有细菌叶绿素 a(375 ~ 382、585 ~ 596、798 ~ 806 nm 处的吸收峰)及类胡萝卜素(448 ~ 454、480、508 ~ 512 nm 处的吸收峰)。活细胞的光吸收特征进一步表明它们属于紫色非硫细菌。

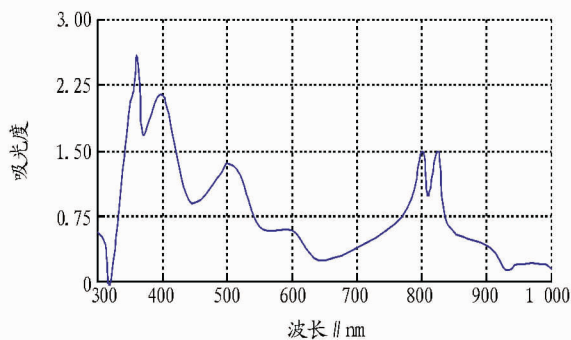
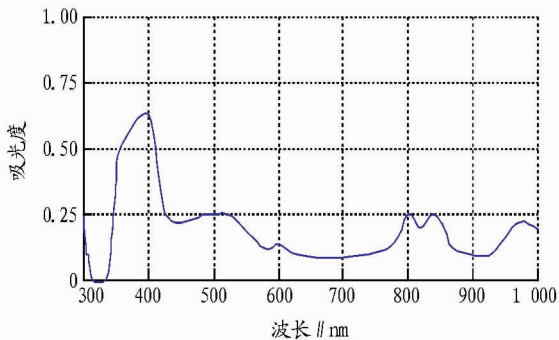


图 3 菌株 GB-1 活细胞(左)及离体色素(右)光吸收图谱

2.2.3 生理生化特征。 由表 1 可知,该菌能利用部分小分子有机物作为碳源和供氢体生长,属于能进行光能异养生长的光合细菌。它在以 Na₂S 为唯一光合供氢体的培养基中微弱生长。

查对《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版),GB-1 符合红螺菌科红假单胞菌属的种属特性,并且与文献^[5]报道的沼泽红假单胞菌特征相似,故初步鉴定该菌为沼泽红假单胞菌(*Rhodospirillum rubrum*)。

表 1 GB-1 的生理生化特性

鉴定项目	结果	鉴定项目	结果
乙酸钠	++	柠檬酸钠	+
丙酸钠	+	谷氨酸钠	+
葡萄糖	-	硫代硫酸钠	-
甘油	+	硫化物	+
乙醇	+	过氧化氢酶	+
果糖	-	淀粉水解	-
乳酸钠	++	明胶液化	-
酒石酸钠	-		

注：+ 为阳性，- 为阴性。

2.3 紫色非硫光合细菌 GB-1 的生长特性 光照、氧、pH 及盐度是影响紫色非硫光合细菌生长的重要因素。图 4~6 显示了 GB-1 的生长特性。

由图 4 可知,白炽灯光微氧环境最适宜 GB-1 生长,测得此条件下的温度为 32~35℃。

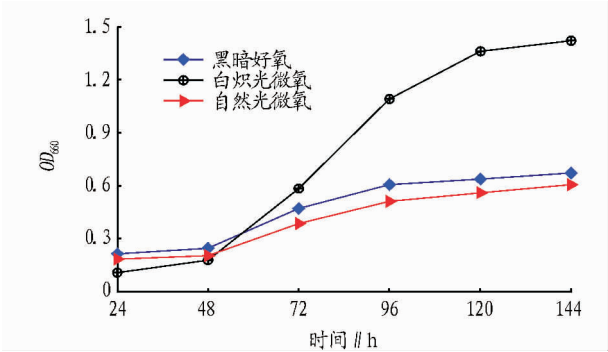


图 4 光照与溶解氧对光合细菌 GB-1 生长的影响

由图 5 可知,光合细菌 GB-1 适宜在低 NaCl 浓度 (<1%) 下生长。随着 NaCl 浓度的增加,GB-1 生长速率的减慢幅度较大,当 NaCl 浓度为 5% 时生长已很微弱。

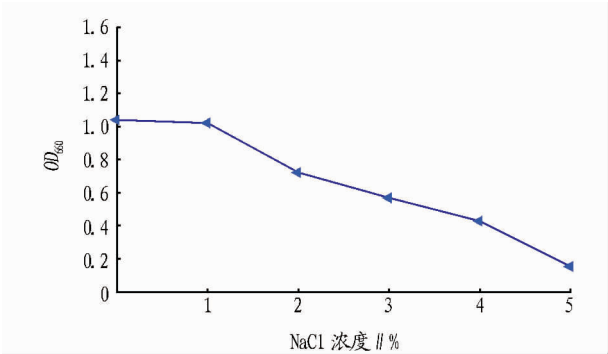


图 5 NaCl 浓度对菌株 GB-1 生长的影响

由图 6 可知,GB-1 在弱碱性条件下的生长速率比酸性条件下要快,最适生长 pH 范围为 8.0~9.0。

2.4 菌株 GB-1 转化 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 能力 以乙酸钠为碳源,分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_2 为唯一氮源研究菌株 GB-1 菌株 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度的变化情况。由图 7 可知,7 d 后培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度由 250 mg/L 降至 125.74 mg/L, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度由 150 mg/L 降至 78.82 mg/L,转化率分别达到 57.71% 和 47.45%。

3 结论

从池塘底泥中富集分离得到一株紫色非硫光合细菌,编

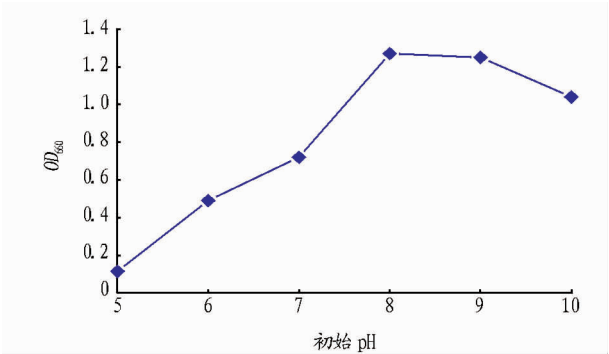


图 6 初始 pH 对菌株 GB-1 生长的影响

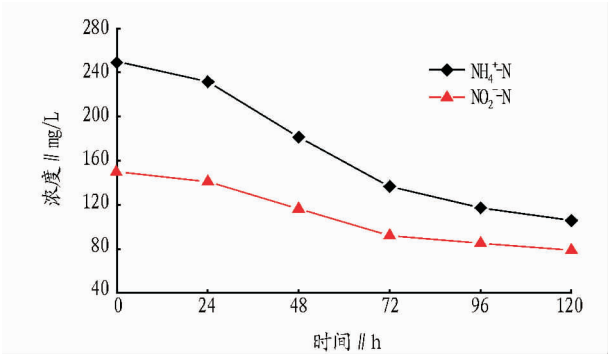


图 7 GB-1 在微氧光照条件下对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化情况

号为 GB-1。根据菌株的形态、活细胞光吸收特征及生理生化分析,鉴定该菌为沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*)。该菌的最适生长条件为:pH 8~9,32~35℃,白炽灯光照微氧,NaCl≤1%。在初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度分别为 250 和 150 mg/L 培养时,7 d 后 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化率分别达到 57.71% 和 47.45%,显示在水质净化方面有良好的应用前景。

参考文献

[1] CARSTEN VOGT U F. Influence of reduced inorganic sulfur compounds and oxygen on DMS oxidation and DMSO reduction by the marine purple ‘nonsulfur’ bacterium *Rhodoculum sul idophilum* strain W4[J]. Microbiological Research,1998,153(3):219–226.

[2] LAURINAVICHENE T V,LAURINAVICHIOUS K S,BELOKOPYTOV B F, et al. Influence of sulfate-reducing bacteria, sulfide and molybdate on hydrogen photoproduction by purple nonsulfur bacteria [J]. International Journal of Hydrogen Energy,2013,38(4):5545–5554.

[3] KAEWSUK J,THORASAMPAN W,THANUTTAMAVONG M,et al. Kinetic development and evaluation of membrane sequencing batch reactor(MSBR) with mixed cultures photosynthetic bacteria for dairy wastewater treatment [J]. Journal of Environmental Management,2010,91(5):1161–1168.

[4] HUANG J S,WU C S,JIH C G,et al. Effect of addition of *Rhodobacter* sp. to activated-sludge reactors treating piggery wastewater [J]. Water Research,2001,35(6):3867–3875.

[5] 于温旭,钱新民. 紫色非硫光合细菌的研究I 沼泽红假单胞菌的分类鉴定和生理特性[J]. 山东大学学报:自然科学版,1991,26(3):343–351.

[6] IZU K,NAKAJIMA F,YAMAMOTO K,et al. Aeration conditions affecting growth of purple nonsulfur bacteria in an organic wastewater treatment process[J]. Systematic and Applied Microbiology,2001,24(2):294–302.

[7] 邱宏端,徐姗姗,朱航,等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J]. 水产学报,2002,26(3):231–236.

[8] 张道南,孙其焕,陈乃松,等. 红螺菌科光合细菌的分离、培养及其作为鱼虾类饵料添加剂的初步研究[J]. 水产学报,1988,12(14):367–369.

[9] SHIPMAN R H,FAN L T,KAO I C. Single-cell protein production by photosynthetic bacteria[J]. Advances in Applied Microbiology,1977,21:161–

183.

[10] SASIKALA C, RAMANA C V. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I. production of single-Cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones, and enzymes and use in waste treatment[J]. Advances in Applied Microbiology, 1995, 41: 173–226.

[11] KHUSNUTDINOVA A N, OVCHENKOVA E P, KHRISTOVA A P, et al. New tolerant strains of purple nonsulfur bacteria for hydrogen production in a two-stage integrated system[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(10): 8820–8827.

[12] LEE C M, HUNG G J, YANG C F. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* WP 3-5 in a serial photobioreactor fed with hydrogen fermentation effluent[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(18): 8350–8356.

[13] MELNICKI M R, EROGLU E, MELIS A. Changes in hydrogen production

and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(15): 6157–6170.

[14] 黄志勇, 王海胜, 蒋培霞, 等. 几株光合细菌的分离鉴定及在养殖罗非鱼中的应用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 72–78.

[15] 冯有智, 林先贵, 王小明. 紫色非硫细菌固体石蜡双层平板培养法[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1435–1442.

徐姗姗, 邱宏端, 林娟, 等. 紫色非硫光合细菌的分离鉴定及其功能研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2004, 32(2): 247–251.

[16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 21–31, 364–398.

[17] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册编译组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 16–29.

(上接第 4 页)

培养基中摇床培养后,发现发酵液的颜色也与菌落颜色接近,基本靠近白色。

2.7 二次诱变多糖和生物量的测定 由表 4 可知,编号为 P-6-c-I 的菌落大小明显大于出发菌 P-0,且多糖产量经过 2 次诱变达原始菌株的 3 倍多,达到了提升多糖产量的目的。

表 3 P-6-c 菌株和变异菌株的菌落特征

编号	菌落颜色	菌落直径 mm	菌落特征
P-6-c	浅黄色	11	菌落较大,呈圆形,表面平滑,中心凹陷,有褶皱
P-6-c-I	米白色	14	菌落较大,表面平滑,边缘有白色绒毛状菌丝
P-6-b-II	浅黄色	9	菌落呈圆形,表面干燥,边缘有浅黄色绒毛状菌丝
P-6-c-III	浅灰色	13	菌落较大,呈不规则状,边缘有灰色绒毛状菌丝

表 4 普鲁兰多糖产量

编号	发酵液	菌体干	生物量	多糖产量
	体积//ml	重//g	g/L	g/L
P-6-c	30	0.384 9	12.83	6.86
P-6-c-I	30	0.442 3	14.74	9.57
P-6-c-II	30	0.456 8	15.22	8.03
P-6-c-III	30	0.506 9	16.89	8.61

2.8 遗传稳定性测试 为了保证菌株的多糖产量稳定,将 P-6-c-I 号菌株连续传代培养 10 代,分别测定多糖产量和 pH。由表 5 可知,该变异菌株的多糖产量没有太大变化,发酵液最终颜色为米白色,pH 为 4.2~4.4。

表 5 普鲁兰多糖产量分析

编号	发酵液颜色	pH	多糖产量//g/L
P-6-c-I ₁	米白色	4.2	9.23
P-6-c-I ₂	米白色	4.2	9.02
P-6-c-I ₃	米白色	4.2	9.59
P-6-c-I ₄	米白色	4.3	9.82
P-6-c-I ₅	米白色	4.4	9.45
P-6-c-I ₆	米白色	4.2	9.79
P-6-c-I ₇	米白色	4.3	9.64
P-6-c-I ₈	米白色	4.3	9.98
P-6-c-I ₉	米白色	4.4	9.33
P-6-c-I ₁₀	米白色	4.2	9.67

3 结论与讨论

自从 1938 年 Bauer 发现出芽短梗霉可以产生一种黏性物质^[6],并在 1959 年被定义为普鲁兰后,国内外的科研工作

者们对普鲁兰的研究一直没有停止过。对于普鲁兰的研究主要有几个方面:优化培养基的组成,探索最佳的发酵条件;高产低色素菌株的诱变筛选;工业化生产降低成本以及对多糖结构和应用的研究。其中,高产低色素菌株的诱变筛选一直是较根本的问题。在国内,高产低色素的出芽短梗霉菌株难以获得且发酵周期长,导致生产成本过高,无法实现工业化生产。目前,对于出芽短梗霉,常见的诱变方式有利用紫外线、亚硝酸和硫酸二乙酯(DES)等诱变剂来对菌种进行诱变^[7-9],而对于物理性方法研究得较少。该研究首先对出芽短梗霉摇床培养,确定诱变的最佳时间为 4~16 h,并且通过测定多糖和生物量,确定菌种的发酵周期,然后在菌种的对数期进行高压电晕电场诱变,实现多糖的提高,由 P-0 号菌株的 3.13 g/L 提高至 P-6-c-I 号菌株的 9.57 g/L,变化显著。试验中,出芽短梗霉黑色素的生成降低,菌落颜色由最开始的黑灰色变成米白色。对比国内外的一些先进研究成果,还有一定差距。分析原因,可能是原始菌种的选择不同,出发菌多糖产量相对较低。但是,采用电晕电场诱变的方法的确是有效可行的,以后若采取更多方式复合诱变,则可达到更好的预期效果。研究表明,以 P-0 为出发菌,对 P-0 进行高压电晕电场诱变,在临界放电电压 4.4 kV 下诱变 60 min。经过 2 次连续诱变,多糖产量达 9.57 g/L,是原始菌株 P-0 的 3 倍多,发酵液颜色为米白色,最终 pH 为 4.2 左右,连续传代培养 10 代,其性状和产量无明显变化,传代稳定。

参考文献

[1] 杨西江,徐田华,徐玲,等.普鲁兰多糖的应用及研究生产现状[J].发酵科技通讯,2010,39(4):25–28.

[2] KACHHAWA D K, BHATTACHARJEE P, SINGHAL R S. Studies on downstream processing of pullulan[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 52(1): 25–28.

[3] ISRAILIDES C J. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 613–617.

[4] 贺红星. 高产低色素普鲁兰生产菌株的复合筛选和发酵条件研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.

[5] 任永娥, 江宁, 谢浩旭, 等. 几株出芽短梗霉在不同发酵条件下产生多糖的比较[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 146–149.

[6] BAUER R. Beitrage zur physiologie von dematiumpullulans de bary[J]. Zentr Bakteriol Parastenk, Abt, 1938, 98: 392–398.

[7] 张雯, 张盛贵. 复合诱变选育出芽短梗霉高产菌株[J]. 中国酿造, 2008(9): 47–50.

[8] 靳建忠, 王慧娟, 孔维甲, 等. 紫外诱变选育出芽短梗霉高产普鲁兰糖白化突变菌株[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 187–191.

[9] 万翠香, 王贤卓, 郭建军, 等. 高产无色素普鲁兰糖突变菌株 P1012 的选育及发酵性能研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 101–106.