应用与环境生物学报 2003,9(3):298~301
Chin J Appl Environ Biol = *ISSN 1006-687X* 2003-06-25

嗜盐光合细菌的分离鉴定及其营养成分分析*

王绍校 杨惠芳 黄志勇 曹文伟[1] 刘志培**
(中国科学院微生物研究所 北京 100080)
([1] 辽宁师范大学生物系 大连 116021)

摘 要 从大连海岸的海泥中分离到4株海洋光合细菌:菌株C410、菌株DS2、菌株E_3和E_4,它们都能在厌氧光照下营光异养生长,菌株C410还能够利用还原性硫化物营光自养生长.依菌对NaCl的需求,菌株C410、DS2归属于嗜盐光合细菌,菌株E_3和E_4属于耐盐光合细菌.根据形态和培养特征、生理生化特征、光合作用内膜结构、泛醌组成、(G+C)的摩尔百分比等指标,菌株C410鉴定为*Rhodovulum sulfidophilus*(嗜硫小红卵菌)、菌株DS2鉴定为*Rhodobium marinum*(海红菌)、菌株E_3和E_4鉴定为*Rhodobacter azotoformans*.4株菌的营养成分分析表明,它们的细胞的最大生长量为4×10^9 mL^{-1}.粗蛋白含量占细胞干重的55%左右,菌株DS2高达64.2%.4菌株所含氨基酸种类齐全,特别具备人和动物所必需的氨基酸.4株菌均含有辅酶Q10和类胡萝卜素.其中菌株C410的类葫萝卜素含量最高. 图1 表6 参14

关键词 海洋光合细菌;嗜盐紫色非硫细菌;分离鉴定;营养成份
CLC Q939.106

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MARINE PHOTOSYNTHESIS BACTERIA AND ANALYSIS OF THEIR NUTRITIONAL COMPOSITIONS

WANG Shaoxiao, YANG Huifang, HUANG Zhiyong, CAO Wenwei[1] & LIU Zhipei**
(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100080, China)
([1]*Department of Biology, Liaoning Normal University*, Dalian 116021, China)

Abstract Four strains of marine photosynthesis bacteria were isolated from seawater and the sediments of Dalian coast. All four strains were motile. They required one or more kinds of growth factors. The isolates were able to grow anaerobically in light or aerobically in dark. Strain C410, E_3 and E_4 contained vesicular intracytoplasmic membranes unlike strain DS2, which contained a lamellar one. Because salt was necessary for the growth of strains C410 and DS2, they belonged to halophilic purple nonsulfur bacteria. Strains E_3 and E_4 belonged to salt tolerant purple nonsulfur bacteria. Strain C410 grew well using sulfide or thiosulfate as electron donors for phototrophic growth. They were identified as *Rhodovulum sulfidophilus* (strain C410), *Rhodobium marinum* (strain DS2), and *Rhodobacter azotoformans* (strains E_3 and E_4). Their cell yields, protein contents, amino acid compositions, and contents of carotenoids were analyzed under the optimum conditions. All of the most cell yields of the four strains were more than 4×10^9/mL^{-1}. Their protein contents of dry weights were about 55% (for strain DS2 it was 64.2%). They contained all kinds of essential amino acids, and also contained coenzyme Q10 and carotenoid. The carotenoid content of strain E_3 was the most among the four strains. Fig 1, Tab 6, Ref 14

Keywords marine photosynthesis bacteria; halophilic purple nonsulfur bacteria; isolation and identification; nutrient composition
CLC Q939.106

光合细菌(photosynthesis bacteria)是以光为能源,在缺氧条件下,以有机小分子化合物或二氧化碳为碳源进行繁殖的微生物;是地球上最早出现的具有原始光能合成体系的原核生物,它们广泛分布于湖泊、海洋、土壤中.光合细菌在自然水体中是水生生态系统食物链及物质循环的重要组成部分,水生生物的排泄物、饵料残渣及排入的有机污染物被分解为有机酸、氨基酸等后,可以被光合细菌作为光合原料加以利用,从而起到净化水质的作用.此外,光合细菌富含蛋白质,含量高于大豆,光合细菌还富含B族维生素、醌类及多种生理活性物质.对于开发饲料的新来源、探索食物人工合成有独特的意义.其中紫色非硫细菌(purple non-sulfur bacteria)是光合细菌中最常见、种类最多、分布最广、最具有应用潜力的一类.该菌群在菌种分离[1]、废水处理[2]、水产养殖[3]以及其它方面[4]取得了很多成果.国外报道,目前的嗜盐光合细菌共有9种[5].而国内的研究多集中在淡水种群,极少涉及海洋光合细菌,特别是嗜盐光合细菌的研究,至今尚未见有报道.

本文从海水及底泥中分离到海洋光合细菌,对它们进行了

收稿日期:2002-06-24 接受日期:2002-09-11
*海洋863项目(2001AA623040)资助 Supported by Marine 863 Project (No. 2001AA623040)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail:liuzhipei@hotmail.com)

鉴定，其中 2 株归属于嗜盐紫色非硫细菌，另 2 株为耐盐紫色非硫细菌. 确定了它们的最适培养特征. 对它们的蛋白质、氨基酸、辅酶 Q、类胡萝卜素等营养成分进行了分析. 为丰富我国的海洋光合细菌资源，海水净化、海产养殖、饲料添加剂、提高鱼虾等的免疫力的应用奠定基础.

1　材料和方法

1.1　菌种的分离、培养和鉴定

本实验所用样品来自大连市沿海地区的海水和底泥.

称取 1 g 样品接入装有 100 mL 含盐的 AT 培养基[6]中，光照厌氧培养 5 ~ 15 d，光照度为 1 000 lx，待有红色、褐色或绿色生长物明显生长后，应用软琼脂深层逐级稀释法分离单菌落，视纯化效果分离转接 3 代或更多代，直至获得纯菌株并用显微镜镜检.

细胞形态结构、革兰氏、鞭毛、荚膜染色[7]后在显微镜下(1 500 倍)观察. 制作超薄切片在电镜下观察内膜结构影. 氮源试验、碳源试验、生长因子试验、硫化物和硫代硫酸盐光能自养生长试验参照 Hiraishi[8].

1.2　测定方法

1.2.1　菌量测定　采用琼脂深层稀释法和称细胞干重.

1.2.2　菌体的吸收光谱　用 60% 蔗糖溶液重悬干净菌体，在光谱仪(HP 8452A)上测定.

1.2.3　DNA 的提取及 x(G + C)/% 测定　按文献[9]进行.

1.2.4　总蛋白质含量的测定　采用凯氏定氮法[10]；17 种常见氨基酸采用酸水解法用 Beckman6300 高效氨基酸分析仪测定，色氨酸按参考文献[10]测定；类胡萝卜素的相对含量测定见文献[11]；醌的提取与测定见文献[12].

2　结果

2.1　菌株的分离和鉴定

从大连海岸的海水和底泥中分离到 4 株海洋光合细菌，菌株 C410、DS2、E_3、E_4，其鉴定特征列于表 1 和表 2. 厌氧光照培养下，4 株菌的菌体细胞分别呈现出紫褐色、粉红色、棕绿色和棕色等颜色，能利用一些低分子的有机酸、有机醇和糖类作为碳源，营光异养生长，特有菌株 C410 能利用还原性硫化物作为光合电子供体营光自养生长. 所试 10 种氮源中除硝态氮外，其他 8 种氮源都能利用. 它们的光内膜结构分别为：囊泡状和片层状(图 1 和表 1). 表 1 的结果表明：菌株 C410、DS2 只能在含有 NaCl 海水中生长，最高盐度可达 10%，而菌株 E_3 和 E_4 在无 NaCl 时均可生长，由此确认：菌株 C410、DS2 应归属于嗜盐紫色非硫细菌，菌株 E_3、E_4 属于耐盐紫色非硫细菌. 4 株分离菌的 DNA 碱基组成(x(G + C)/%)与标准菌株相近(表 3). 根据《伯杰氏系统细菌学手册》第九版[5]，并查阅了紫色非硫细菌中的有关属、种的最新报道，把 4 株菌分别鉴定为：菌株 C410 — *Rhodovulum sulfiphilus*（嗜硫小红卵菌）[5]，菌株 DS2 — *Rhodobium marinum*（海红菌）[8]，菌株 E_3、E_4 — *Rhodobacter azotoformans*[13].

表 1　分离菌株的形态和培养特征

Tab 1　Phenotypes of four isolates

	Strain C410	Strain DS2	Strain E_3	Strain E_4
Colonies	圆形，褐色 Brown circle	卵圆形，粉色 Pink ovate	圆形，棕绿色 Brown-blue circle	圆形，深棕色 Dark brown circle
Cells	卵圆到杆形 Ovate to rod	杆状 Rod	球形到卵圆形 Spheric to ovate	球形到卵圆形 Spheric to ovate
Cell size (d/mm)	0.8 - 2.0 × 0.6 - 1.0	1.5 - 2.0 × 0.6 - 1.0	0.7 - 1.0	0.7 - 1.0
粘液 Mucosa	+	-	+	+
内膜结构 Intracytoplasmic membranes	囊泡状 Vesicular	片层状 Lamina	囊泡状 Vesicular	囊泡状 Vesicular
Flagellum	Polar single	Multi	Polar single	Polar single
E_{opti}/lx	2 200	700 ~ 2 200	1 500	700
NaCl range for growth (w/%)	1 - 10	1 - 10	0 - 7	0 - 7
Optimal NaCl (w/%)	4	4	1	1
Optimal temp (θ/℃)	29	29 ~ 37	29 ~ 37	29 ~ 37
Growth factor	烟酸　Niacin	复杂　Multiplicity	烟酸　Niacin	烟酸　Niacin

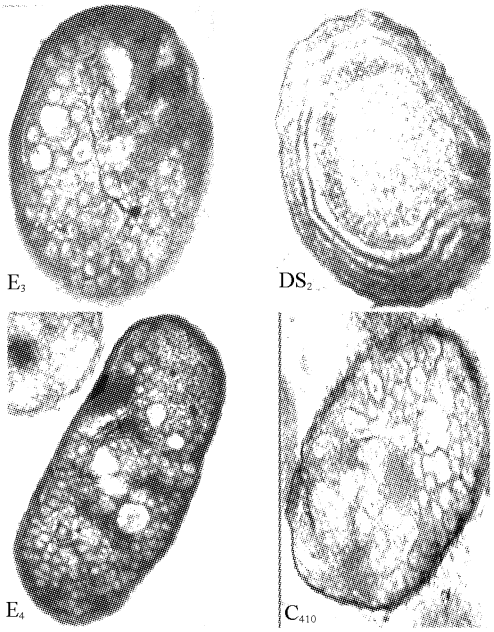

图1 4株菌光内膜结构电镜照片
Fig 1 Electron photograph of photo-intracytoplasmic membranes of four strains

2.2 营养成分分析

2.2.1 分离菌株的菌生长量和蛋白质含量 测定结果见表4,所分离的4株光合细菌菌体生长量都在4×10^9 mL^{-1}以上,细胞干重在1~2 g/L.它们都含有较为丰富的蛋白质,其粗蛋白含量分别占细胞干重的50%~60%左右.其中菌株DS2的蛋白质含量最高,高于荚膜红假单胞菌(57.95%)、球形红假单胞菌(58.6%)和酵母菌(*ESS. nestle*)(54%)[6].

2.2.2 蛋白中氨基酸含量 氨基酸含量的测定结果见表5,4株菌都有较高含量的必需氨基酸,菌株C410:433.16 mg/g,菌株DS2:422.88 mg/g,菌株E_3:427.02 mg/g,菌株E_4:453.33 mg/g,都高于常见的植物蛋白,只略低于鸡蛋(512 mg/g)、牛乳(504 mg/g)、牛肉(480 mg/g)和鱼(485 mg/g)等,而且各种必需氨基酸含量均衡,没有限制性氨基酸,为优质的蛋白资源.其中,菌株C410的色氨酸含量为33.97 mg/g,是鸡蛋(17 mg/g)、牛乳(14 mg/g)、牛肉(12 mg/g)和大豆(14 mg/g)[14]的两倍多,极为罕见.

2.2.3 细胞色素和生理活性物质 光合细菌细胞中富含细菌叶绿素和类胡萝卜素,还含有辅酶Q等生理活性物质,细胞色素可以提高细胞的有氧代谢水平,辅酶Q是呼吸链中的电子传递体,可以改善动物的心血管功能,具有抗氧化抗衰老的作用.4株菌均含有多种细菌叶绿素和类胡萝卜素等天然色素,总类胡萝卜素含量以菌株C410为最高(表6).4株菌主要含有生理活性物质辅酶Q10(表6).

表2 分离菌株的生理生化特性
Tab 2 Physiological and biochemical characterization of isolates

	Strain C410	Strain DS2	Strain E_3	Strain E_4
Assimilation of carbon sources				
Sodium gluconate	−	+	+	+
Sodium lactate	−	−	+	+
Sodium succinate	+	+	+	+
Sodium glutamate	+	+	+	+
Pyruvic acid	+	+	−	−
NaAc	+	+	+	+
Sodium malate	+	+	+	+
Aspartic acid	−	−	+	+
Sucrose	+	−	+	+
Sodium formate	−	−	+	+
Alcohol	+	+	+	+
Glucose	+	−	+	−
Sodium tartrate	−	−	−	−
Sodium arginine	−	−	+	−
Sodium citrate	−	−	−	−
Glycerol	+	+	+	+
Sodium benzoate	−	−	−	−
Mannitol	−	−	+	+
Utilization of nitrogen sources				
Sodium glutamate	+	+	+	+
Peptone	+	+	+	+
NH_4NO_3	+	+	+	+
Arg	+	+/−	+	+
KNO_3	−	−	−	−
$NaNO_2$	−	−	−	−
Hydrolyzed casein	+	+	+	+
NH_4Cl	+	+	+	+
Met	+	+	+	+
Yeast extract	+	+	+	+
Electron donor (CO_2 as carbon source)				
0.5 mmol L^{-1} Na_2S	+	+	−	−
2.0 mmol L^{-1} Na_2S	+	−	−	−
5.0 mmol L^{-1} Na_2S	−	−	−	−
2.0 mmol L^{-1} $Na_2S_2O_3$	+	−	−	−

Note: +, Growth; −, No growth

表3 分离菌株和标准菌株DNA的$x(G+C)/\%$
Tab 3 $x(G+C)/\%$ of DNA of isolates and standard strains

Isolate	$x(G+C)/\%$	Standard strain	$x(G+C)/\%$
C410	65.38	*Rhodovulum sulfiphilus*[1]	66.3~66.6
DS2	62.05	*Rhodobium marinum*[8]	61.5~64.1
E_3	66.73	*Rhodobacter azotoformans*[13]	69.5~70.2
E_4	67.23	*Rhodobacter azotoformans*[13]	69.5~70.2

表4 分离菌株的菌体生长量和细胞蛋白含量
Tab 4 Cell growth and protein content of isolates

		Isolate				CK[6]		
		C410	DS2	E_3	E_4	*Rhodopseudomonas capsulatum*	*Rhodopseudomonas globiformis*	*ESS. nestle*
Cell yield	Liquid (n/mL^{-1})	12×10^9	4×10^9	7×10^9	9×10^9	−	−	−
	Dry weight (ρ/g L^{-1})	1.85	1.13	1.42	1.34	−	−	−
Protein content in dry cell (w/%)		40.6	63.2	55.6	53.7	57.9	58.6	54.0

Note: −, Not determined

表 5　分离菌株蛋白质中的氨基酸的 w/mg g^{-1}
Tab 5　w(amino acid)/mg g^{-1} in the isolates protein

Amino acid	Strain			
	C410	DS2	E_3	E_4
* Thr	45.74	46.25	45.27	48.75
* Val	55.54	58.35	64.64	68.79
* Met + Cys	35.79	36.70	33.05	33.67
* Ile	41.38	44.03	39.12	41.25
* Leu	83.10	84.60	78.79	81.92
* Phe + Tyr	75.30	74.43	81.35	91.51
* Lys	43.30	46.95	49.48	49.14
* Trp	33.97	14.40	13.92	16.07
His	19.04	17.17	21.40	22.23
Asp	87.59	99.76	85.25	84.26
Ser	30.64	35.03	31.38	32.31
Glu	111.53	158.13	120.61	125.98
Pro	32.59	36.98	40.04	43.65
Gly	50.49	60.73	58.35	54.92
Ala	90.79	96.68	103.22	100.11
Arg	26.55	65.47	70.36	69.26

* 为必需氨基酸　Essential amino acid

3　讨论

从我国大连海岸的海水和海泥中分离到 4 株海洋光合细菌，依据菌对 NaCl 的需求，菌株 C410 和 DS2 属于嗜盐紫色非硫细菌，菌株 E_3 和 E_4 属于耐盐紫色非硫细菌. 按生物学特征，对 4 株菌做了深入的细菌鉴定，丰富了我国的光合细菌资源，填补了我国嗜盐紫色非硫细菌研究的空白，为扩大光合细菌的应用提供优良菌种和理论基础.

在缺氧光照条件下，4 株海洋光合细菌可利用多种有机物为碳源和氮源，营光异养生长. 菌种 C410 能利用还原性硫化物为光合电子供体，营光自养生长. 这些代谢的多样性对净化海水、海产养殖地和高盐含硫废水的生物治理将具有重要意义. 菌种 E_3 和 E_4 除净化海水外还有净化淡水水体的作用.

4 株海洋光合细菌菌体收率高达 4×10^9 mL^{-1} 以上，细胞蛋白含量与同类细菌相差无几，菌株 DS2 的蛋白含量高于其他光合细菌和酵母[6]. 这些细菌所含的氨基酸种类齐全，尤其是人和动物必需的氨基酸齐全. 菌株 C410 的色氨酸含量高，是良好的色氨酸来源，这些菌株还含有细菌叶绿素和类胡萝卜素等天然色素，以及辅酶 Q10 等生理活性物质，在作为土壤肥料、禽畜饲料、水产饵料、医药保健等诸多方面将具有广阔的前景.

表 6　分离菌株细胞吸收光谱、吸收峰、总类胡萝卜素含量和辅酶
Tab 6　Cell absorption spectrum and peak, total carotenoid content and coenzyme

	Strain C410	Strain DS2	Strain E_3	Strain E_4
吸收峰 (λ/nm) Absorption peak	378,478,514, 594,804,458	380,508,592, 550, 792	424,448,478,510, 592,674,802	420,450,478,510, 592,672,802
细胞色素 Cytochrome	细菌叶绿素 a,球形烯系列类胡萝卜素	细菌叶绿素 a, 螺菌黄素	细菌叶绿素 a,球形烯系列类胡萝卜素	细菌叶绿素 a,球形烯系列类胡萝卜素
总类胡萝卜素 (w_{DW}/mg g^{-1}) Total carotenoid	13.40	1.37	8.63	9.17
主要辅酶 Coenzyme	Q10	Q10	Q10	Q10

References

1 Li J(李筠), Xu B(许兵), Yin XY(尹欣业), Xu HS(徐怀恕), Shi J(石杰). Isolation, identification and growth conditon of *Rhodopseudomonas* strains. *J Ocean Univ Qingdao*(青岛海洋大学学报). 1995, **25**(2): 187 ~ 192

2 Cheng SP(程树培), CuiYB(崔益斌), Shen WM(申为民), Ding SR(丁树荣). Study on the treatment of monosodium glutamate processing wastewater by photosynthesis bacteria in an external air lift reactor. *Environm Sci*(环境科学). 1994, **15**(2): 6 ~ 10

3 You JH(游锦华), Chen YB(陈怡飚). Application effect of photosynthesis bacteria in the seed breed of sea prawn. *Acta Hydrobiol sin*(水生生物学报). 1995, **19**(1): 94 ~ 96

4 Cheng SP(程树培), Geng XL(耿小六). Protoplast fusion of photosynthesis bacteria among species and the identification of fusants . *Journal of Nanjing Univ*(*Nat Sci Ed*)(南京大学学报(自然版)). 1993, **29**(3): 407 ~ 413

5 Imhoff JF, Trüper HG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th, Williams & Wilkin Company, Baltimore. Purple Nonsulfur Bacteria. In: Trüper A, Dworkin HG, Harde M ed. The Prokaryotes, 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-verlag, 1992. 1658 ~ 1682

6 Liu RL(刘如林) ed. Photosynthesis bacteria and their applications (光合细菌及其应用). Beijing(北京): *China Agricultural Science Press*(中国农业科技出版社), 1991

7 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. (ed). The methods for normal bacteria(一般细菌常用鉴定方法). Beijing: Science Press(科学出版社), 1978

8 Hiraishi A, Urata K, Satoh T. A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. noc. *Int J Syst Bacateriol*, 1995, **45**(2): 226 ~ 234

9 Xu DQ(徐德强). Systematic bacteriology. National symposium on systematic bacteriology. 1997, Yantai(烟台)

10 Lu ZX(鲁子贤). Methods in protein and ezymology(蛋白质和酶学研究方法). Beijing: Science Press(科学出版社), 1989

11 Han YS(韩雅珊). Experimental manual for food chemical(食品化学实验指南). Beijing: China Agricultural University Press(中国农业大学出版社). 1992

12 Wu CH(吴诚华), Lu XT(陆小涛), Qin M(秦敏), Ruan JS(阮继生). Analysis of quinone of microbial cells by HPLC. *Microbiol*(微生物学通报). 1998, **16**: 176 ~ 178

13 Hiraishi A, Muramatsu K, Urata K. Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. *J Ferm Bioeng*, 1995, **79**(1): 39 ~ 44

14 Wang Z(王璋), Xu SY(许时婴), Tang J(汤坚). Food chemistry(食品化学). China Light Industrial Press(中国轻工业出版社), Beijing