

氧化还原条件对紫色硫和非硫细菌生长的作用*

楊 蕙 芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

紫色硫和非硫细菌是二种主要的光合作用细菌。根据它们的生理特性, 紫色硫细菌是自养的厌氧细菌, 而紫色非硫细菌属于异养的兼性厌氧细菌。它们能在含硫化氢、无机硫化物或有机酸的培养基中很好地发育^[1]。培养基的氧化还原条件是光合作用细菌生长的一个重要物化因子, 自从1931年 van Niel^[2] 提出以后曾有过一些报导^[3-7], 然而, 从以往报导来看, 该细菌生长所要求的氧化还原电位范围没有得到统一认识, 尤其在紫色硫细菌生长的 rH_2 范围存在较大的差异, 这表明了还有必要对这方面材料做更广泛的研究, 因此, 我们对从池沼中分离出来的紫色硫和非硫细菌也进行了氧化还原电位研究, 来探讨在正常的厌氧情况下这些细菌生长过程中氧化还原电位的变化特征、生长所需范围和最适氧化还原条件。

一、材料和方法

菌种 试验所用的紫色硫和非硫细菌是按照 van Niel^[2,8] 的方法从北京西郊池沼中分离出来的。分离所得的紫色硫细菌是椭圆形、近似于圆形和二端圆钝的短杆状细胞, 大小为 $1-2 \times 1-1.2$ 微米, 培养基中 Na_2S 含量高时 (0.2—0.3%) 细胞内积累硫滴, 此时细胞大小增大到 $2-3 \times 1.2-2$ 微米, 细胞运动, 严格厌氧, 革兰氏阴性, 能氧化其他无机硫化物 (如: Na_2SO_3 、 $NaHSO_3$) 和有机酸 (如: 醋酸、丙酮酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸等)。大量细胞呈深红色。根据 Виноградский^[9] 的描述和克氏^[10]、贝氏^[11] 鉴定手册鉴定该菌为 *Chromatium minutissimum*。

分离到的紫色非硫细菌为细长杆菌、大小通常为 $1.5-5 \times 0.5-0.7$ 微米, 能运动, 革兰氏阴性, 兼性厌氧, 不能氧化硫化氢和其他无机化合物, 能利用有机酸 (如: 苹果酸、醋酸、丁酸、丙酮酸、琥珀酸、延胡索酸) 作为良好的碳源, 它们生长还需要少量酵母浸出汁和维生素, 该菌能在肉汁蛋白胰培养基上生长, 并形成细小红色菌落, 不液化明胶, 大量培养物为玫瑰色。按照 van Niel^[8] 和贝氏^[11] 分类鉴定手册的描述, 本试验所用的紫色非硫细菌属于 *Rhodospseudomonas* sp.

培养基 培养紫色硫细菌的培养基成分如下: NH_4Cl 0.1%; KH_2PO_4 0.05%; $NaCl$ 0.1%; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.0002%; $NaHCO_3$ 0.4—0.5%; $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.1%; Larsen^[12] 微量元素: B 10 微克%; Co 5 微克%; Cu 0.5 微克%; Zn 10 微克%; Mn 0.5 微克%; pH 7.5—8。

培养紫色非硫细菌所用的培养基成分为: KH_2PO_4 0.012%; K_2HPO_4 0.018%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.04%; 谷氨酸 0.1%; 苹果酸 0.2%; 酵母浸出汁 0.03%; 维生素 H 0.5 微克%。pH 7—7.5。

* 王兴同志参加部分工作。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

培养条件 实验在带有磨口塞的玻璃小瓶(75 毫升)和备有橡皮塞的 150 毫升广口瓶中进行,瓶中装满接有菌的培养液,塞紧瓶塞后用石蜡和石蜡油(1:1)的混合物封口,厌氧培养于 30℃ 保温箱中,距培养物 30 厘米处悬有 100 瓦灯泡连续光照培养。以在培养基中加适量的还原剂和氧化剂来控制原始的氧化还原电位,所用的化合物有 Na_2S 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 Na_2SO_3 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、甲酸、抗坏血酸、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 及 H_2 。培养紫色硫细菌时试验开始的 pH 为 8,紫色非硫细菌的 pH 为 7。

测定方法 培养基的氧化还原电位值用比色法和电位法测定^[13],在 Na_2S 含量大于 0.02% 的情况下借助于氧化还原指示剂比色法测定,其他试验都用白金电极和甘汞电极以真空管电位计(瑞士制 Poly metron 42/B 型和雷磁 25 型酸度计)测定。除测定细菌生长过程中的 Eh 外,还测定 pH, $r\text{H}_2$ 用 Eh 和 pH 换算所得。硫化氢用碘量法测定。丙酮酸和苹果酸用比色法测定^[14,15]。用比浊法换算细胞干重。

二、实验结果

(一) 紫色硫和非硫细菌生长过程中氧化还原电位的变化特征

在含 Na_2S 的无机培养基中接种上 4—5 天的紫色硫细菌(*Chromatium minutissimum*)的新鲜培养液,接种量为总体积的 2%,按期测定生长过程中氧化还原电位的变化,所得的结果见图 1,该培养基原始的 $r\text{H}_2$ 为 9.3,相应的 Eh 等于 -142 毫伏,随着细菌生长速度的提高,氧化还原电位值也向上升,经过 2—3 天 $r\text{H}_2$ 达到 14.5, Eh 为 +11 毫伏,于此同时硫化氢逐渐被氧化。

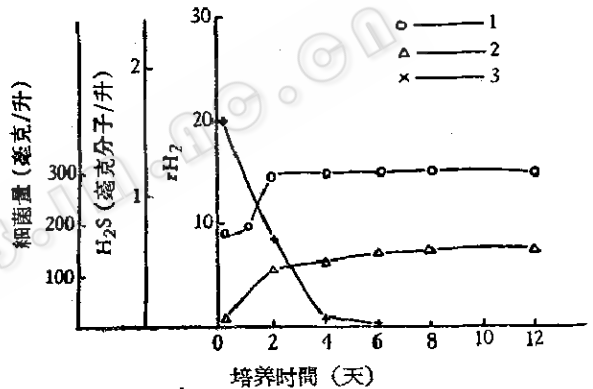


图 1 在含 0.1% Na_2S 的无机培养基中 *Chromatium* 生长时 $r\text{H}_2$ 的变化(1)、细胞的增长(2)和 H_2S 量的变化(3)

紫色硫细菌生长在 0.1% 丙酮酸和少量 Na_2S (0.005%) 的有机培养基中时,原始的氧化还原电位值比无基培养基高($r\text{H}_2$ 为

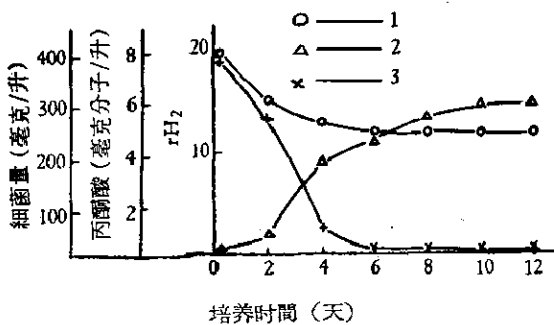


图 2 在 0.1% 丙酮酸和 0.005% Na_2S 的有机培养基中 *Chromatium* 生长时 $r\text{H}_2$ 的变化(1)、细胞的增长(2)和丙酮酸量的变化(3)

紫色硫细菌生长在丙酮酸培养基上有同样的规律性,从图 3 可见,试验开始时 $r\text{H}_2$ 为 25—26,相应的 Eh 为 +340—+380 毫伏,随着细胞数量的增长,苹果酸被利用,氧化还原电位值也随之降低,接种 3—4 天后 $r\text{H}_2$ 降至最低值 (2.5), Eh 等于 -380 毫伏,最后保持 $r\text{H}_2$ 在 3—4, Eh -340—-350 毫伏范围内。

19—19.5, Eh +130—+135 毫伏),在细菌发育的对数期,丙酮酸量迅速下降,此时,氧化还原电位值降至 $r\text{H}_2$ 13.5—14, Eh 为 -30—40 毫伏,经过 6—7 天后 $r\text{H}_2$ 保持在 11—11.5 范围内,相应的 Eh 在 -100—-120 毫伏。

紫色非硫细菌(*Rhodospseudomonas* sp.)是光异养细菌,它们的发育必需需要有机化合物,当它们生长在苹果酸和酵母汁的有机培养基中时,其氧化还原电位的变化与

以上实验表明,紫色硫细菌和紫色非硫细菌都能在氧化还原电位较高的有机酸培养基中正常地进行光同化作用,随着细胞数量增长,氧化性物质被消耗,电位也随之降低。

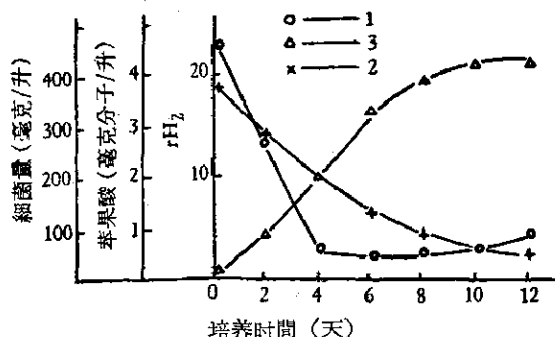


图3 在0.2%苹果酸培养基中 *Rhodospseudomonas* 生长时 rH_2 的变化(1)、细胞的增长(2)和苹果酸量的变化(3)

电位下降的最低值和下降的速度与细菌繁殖强度和菌种的不同有关。紫色硫细菌在无机 Na_2S 的培养基中则有相反的结果,即从原始的低电位向高电位上升。电位上升的原因是由于还原性物质硫化氢被氧化的结果。

(二) 紫色硫和非硫细菌生长的氧化还原条件范围

为了确定不同氧化还原电位对紫色硫和非硫细菌生长的影响和它们生长的 rH_2 范围,我们都采用有机酸培养基, *Chromatium* 培养在丙酮酸培养基中, *Rhodospseudomonas* 培养在苹果酸培养基中,加入前述的还原剂和氧化剂使培养基达到一定的氧化还原电位。试验在厌氧条件下进行,为保证 *Chromatium* 生长的绝对厌氧条件,特别采用新鲜或新煮沸过的培养基,并且接种量增加到4—5%。用不加还原剂或氧化剂的培养液作为对照。

从表1明显地见到,专性厌氧紫色硫细菌只有加入适量的还原剂: Na_2S , $Na_2S_2O_4$ 和

表1 在具有不同氧化还原条件的丙酮酸培养基中 *Chromatium minutissimum* 的生长

试验条件	Eh (毫伏)		rH_2		细胞干重 (毫克/升)
	开始	72小时	开始	72小时	
对照(不加还原剂)	347	347	27.2	27.2	4*
0.005% Na_2S	127	-3	19.3	15.0	120
0.01% Na_2S	-53	-88	13.2	12.0	200
0.02% Na_2S	-98	-118	11.3	11.0	216
0.1% Na_2S	-142	11	9.3	14.5	195
0.2% Na_2S	-172	32	8.3	15.2	226
0.005% $Na_2S_2O_4$	259	257	26.7	26.5	8*
0.01% $Na_2S_2O_4$	-43	-108	12.5	10.8	202
0.02% $Na_2S_2O_4$	-123	-153	9.9	8.9	210
0.05% $Na_2S_2O_4$	-340	-330	3.3	4.0	180
0.05% 抗坏血酸	185	27	21.3	16.0	120
0.05% $Na_2S_2O_3$	322	320	26.5	26.5	4*
0.05% 甲酸	307	307	25.0	25.0	4*

* 见不到细菌生长。

抗坏血酸时才能生长,加这些还原剂使培养基开始的电位在 $Eh - 340$ — $+185$ 毫伏之间, rH_2 相当于3—21。更有意义的是在含0.01—0.2% Na_2S 和0.01%—0.05% $Na_2S_2O_4$ 的培养基中,开始的 rH_2 在13.2以下,细菌繁殖最快,经过72小时细胞干重已达到200—226毫克/升。而在0.005% $Na_2S_2O_4$ 、0.05% $Na_2S_2O_3$ 、0.05% 甲酸和不加还原剂的对照情况下见不到细菌生长,这可能由于此时培养液的电位维持在 $Eh + 300$ 毫伏, rH_2 在25以上对

专性厌氧紫色硫细菌的生长来说已过高,以致抑制了它们的生长。

兼性厌氧紫色非硫细菌可以在氧化还原电位相当广的范围内发育, E_h 可从 -400 到 $+400$ 毫伏, rH_2 $0.5-27$, 结果见表 2。在 0.001% 、 0.005% $K_3Fe(CN)_6$ 和不加还原剂的对照实验中, E_h 等于 $+330-+400$ 毫伏, rH_2 为 $25-26.5$ 时, 试验进行 72 小时后细胞产值最高、(大约 200 毫克/升); 在 0.01% $K_4Fe(CN)_6$ 、 0.005% $Na_2S_2O_4$ 、 0.05% $Na_2S_2O_3$ 、 0.1% $Na_2S_2O_3$ 、 0.05% Na_2SO_3 中 rH_2 等于 $21-23$ 左右, 细菌生长已有减缓, 培养在 0.02% $Na_2S_2O_4$ 和氩气压中, 试验开始的电位很低 (E_h-400 毫伏, $rH_2 1-0.5$) 细菌还能生长。

表 2 在具有不同氧化还原条件的苹果酸培养基中 *Rhodospseudomonas* 的生长

试验条件	E_h (毫伏)		rH_2		细胞干重 (毫克/升)
	开始	72 小时	开始	72 小时	
对照(不加还原剂和氧化剂)	385	-405	26.0	2.8	200
0.001% $K_3Fe(CN)_6$	347	-273	25.0	4.4	195
0.005% $K_3Fe(CN)_6$	409	-280	26.6	4.7	206
0.01% $K_4Fe(CN)_6$	282	197	23.4	21.0	160
0.05% $K_4Fe(CN)_6$	155	93	18.9	17.2	120
0.005% $Na_2S_2O_4$	283	-333	22.7	2.8	168
0.01% $Na_2S_2O_4$	147	-43	17.9	11.5	120
0.015% $Na_2S_2O_4$	-33	-150	11.4	9.0	130
0.02% $Na_2S_2O_4$	-405	-213	0.5	3.3	80
0.05% $Na_2S_2O_3$	297	36	23.6	16.3	100
0.1% $Na_2S_2O_3$	237	40	21.7	17.5	100
0.05% Na_2SO_3	267	43	22.9	18.3	128
0.005% Na_2S	103	22	19.3	15.0	110
0.01% Na_2S	-20	-113	14.6	11.0	70
0.02% Na_2S	-66	-173	12.3	7.8	50
通 H_2	-385	-325	1.1	3.3	78

(三) 不同氧化还原电位对细菌生长过程的影响

不同氧化还原电位对细菌生长过程的影响见图 4。加入 0.01% Na_2S 、 0.02% Na_2S 时 rH_2 低于 13, 在此氧化还原条件下 *Chromatium* 不仅发育较快, 而且试验最终的细胞干重也最高 (300—340 毫克/升)。当 rH_2 等于 19 时, 细菌繁殖的速度虽有减缓, 但试验最终的细胞干重降低不大 (280—290 毫克/升)。加入 0.05% 抗坏血酸时, rH_2 在 21 左右, 接种后头三天细菌生长速度与 rH_2 等于 19 时差不多, 但实验最终的细胞量降低到 200 毫克/升。

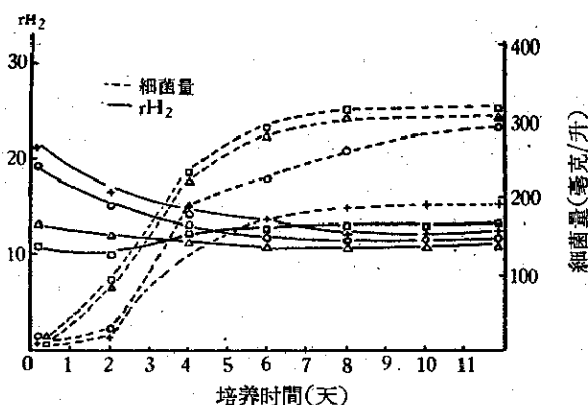


图 4 不同氧化还原条件下 *Chromatium* 在丙酮酸培养基中的发育和 rH_2 的变化

注: ○于培养基中加 0.005% Na_2S ;
×于培养基中加 0.01% 抗坏血酸;
△于培养基中加 0.01% Na_2S ;
□于培养基中加 0.02% Na_2S 。

由此表明,在本文所試驗的条件下, rH_2 低于 13 时对 *Chromatium* 发育最为适宜。

图 5 指出, *Rhodopseudomonas* 发育最适的氧化还原电位是加有 0.001% $K_3Fe(CN)_6$ 和不加任何还原剂和氧化剂的对照实验,于此 rH_2 等于 26—25 时細菌发育旺盛,最后的細胞产量也最高(400—420 毫克/升)。試驗开始的 rH_2 在 20 以下时,細菌发育速度減緩了大約 24—48 小时,最終的細胞量也減低到 320—360 毫克/升左右。

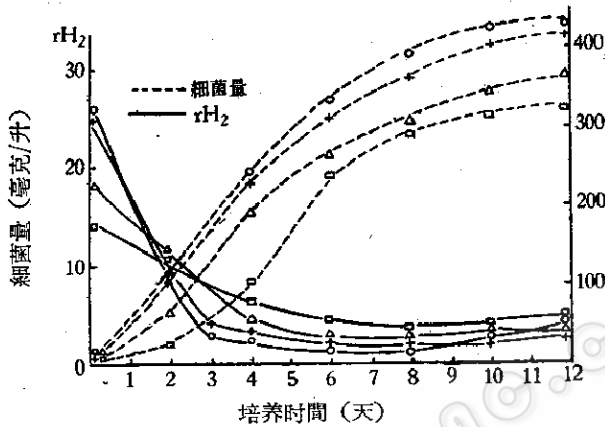


图 5 不同氧化还原条件下 *Rhodopseudomonas* 在苹果酸培养基中的发育和 rH_2 的变化

注: ○对照(在培养基中不加还原剂和氧化剂); +于培养基中加 0.001% $K_3Fe(CN)_6$;
△于培养基中加 0.01% $Na_2S_2O_4$; □于培养基中加 0.01% Na_2S 。

三、討 論

文献中对紫色硫細菌生长所需的氧化还原电位范围的报导是不一致的。Сапожников^[3,4] 指出,紫色硫細菌只有当培养基的 rH_2 值从 12 到 16 时才能进行光还原作用,生长的最适 rH_2 为 14—16,換句話說,該菌生长要求的氧化还原电位范围較狹。而以后 Baas-Becking^[5] 和 Кондратьева^[7] 的研究表明,紫色硫細菌能够在 rH_2 从 0 到 30 的广泛氧化还原条件下发育。从我們的結果来看,虽然与 Кондратьева^[7] 研究的紫色硫細菌是属同一种 (*Chromatium minutissimum*),但我們分离的这种专性厌氧紫色硫細菌却要求比較严格的氧化还原电位条件,当把培养液中的氧赶走后,細菌还不能生长,必需加还原剂把电位降低到 rH_2 21 时才开始生长,生长的 rH_2 范围在 3—21 之間,最适 rH_2 在 13 以下,即界于 Сапожников 和 Кондратьева 所得的結果之間。所以产生这种差别,一方面与試驗菌种有关,如 Сапожников 与 Кондратьева 所用菌种虽同属紫色硫細菌科,但菌种不同。另一方面,本文所研究的紫色硫細菌与 Кондратьева 是属同一种,但也存在差异,說明菌株之間有差异,可能与来源不同及实验条件有密切关系。不管生长范围广狹,从所得生长最适氧化还原电位上来看,所得的結果証实了 van Niel^[2] 和 Larsen^[12] 对培养此类細菌时培养基中要加少量 Na_2S 的建議及光合作用硫細菌进行光还原二氧化碳要求比較低的氧化还原电位的看法是正确的。此外应指出,用 Na_2S 还原剂时对紫色硫細菌生长的促进作用不仅是創造了适于該菌生长的氧化还原电位条件,而且作为給氢体直接参加了細菌的光代謝作用。

在紫色非硫細菌方面,虽然,我們所用菌种按其形态和某些生理特性与 Кондратьева

所研究的 *Rhodopseudomonas palustris* 不同,但是,生长所需氧化还原电位范围 (rH_2 0.5—27) 却同他們的結果 (rH_2 0—30) 相类似,这种生长較广的氧化还原电位范围充分地表现了它們兼性厌氧生理特性。

四、摘 要

紫色硫細菌 (*Chromatium minutissimum*) 发育在含 Na_2S 的无机培养基中,原始的电位較低 ($rH_2 = 9.3$),由于生长过程中 Na_2S 被氧化,氧化还原电位随之升高到 rH_2 14.5。在有机酸培养基中 *Chromatium* 和 *Rhodopseudomonas* 表现出同样的規律性,随着細菌的发育,培养液的电位由高向低的方向变化,紫色硫細菌在含丙酮酸的培养基中 rH_2 由 20 降至 11—11.5,紫色非硫細菌在含苹果酸的培养基中 rH_2 由 25 降低到 2—4。

专性厌氧紫色硫細菌只能生长在加有适量还原剂如: Na_2S 、 $Na_2S_2O_4$ 和抗坏血酸的培养基中,此时 rH_2 在 3—21 范围内,并且 rH_2 低于 13 較为适宜。兼性厌氧紫色硫細菌的生长不需加任何还原剂,它們生长的氧化还原电位范围比較广, rH_2 从 0.5 到 27,其生长最适的 rH_2 在 25—26。

参 考 文 献

- [1] Кондратьева, Е. Н.: Микробиология, 23(6), 719, 1954.
- [2] Van Niel, C. B.: Arch. Microbiol., 3(1): 1, 1931.
- [3] Сапожников, Л. И.: Биохимия, 2(2), 1937.
- [4] Сапожников, Л. И.: Труды Бот. ин-та им. Комарова, АН СССР, 4(8), 106, 1951.
- [5] Baas-Becking L. G. and Wood E. F.: Proc. Konink. Nederlandandse Akad. Van Wetenschappen, Series B. Physical Sciences, 58: 160, 1955.
- [6] Кондратьева, Е. Н.: Микробиология, 26(6), 715, 1957.
- [7] Кондратьева, Е. Н.: Научные доклады высшей школы, 4, 155, 1961.
- [8] Van Niel, C. B.: Bact. Reviews, 8(1): 1944.
- [9] Виноградский, С. Н.: Микробиология почвы, 1952.
- [10] Красильников, Н. А.: Определитель бактерий и актиномицетов, 1949.
- [11] Bergey's manual of determinative bacteriology, 1957.
- [12] Larsen, H.: J. Bact. 64(2): 1952.
- [13] Работнова, И. Л.: Роль физикохимических условий (pH и rH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов, 1957.
- [14] Балаховский, С. Д. и Болховский, И. С.: Методы химического анализа крови, 1953.
- [15] Paech, K. und Tracey, M. V.: Биохимические методы анализа растений, 1960.

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СРЕДЫ В РАЗВИТИИ СЕРНЫХ И НЕСЕРНЫХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Ян Хуэй-фан

(Институт микробиологии АН Китая, Пекин)

Развитие пурпурных серобактерий (*Chromatium minutissimum*) на среде с Na_2S , где начальный потенциал низок ($r\text{H}_2 = 9.3$), сопровождается повышением $r\text{H}_2$ до 14.5 в результате окисления ими сероводорода. При посевах *Chromatium* и *Rhodospseudomonas* на средах с органическими соединениями наблюдалась одинаковая закономерность, потенциал среды изменялся с высокого до низкого одновременно с размножением бактерий. Для пурпурных серобактерий на среде с пировиноградной кислотой $r\text{H}_2$ снижался с 20 до 11—11.5, а для пурпурных несерных бактерий на среде с яблочной кислотой $r\text{H}_2$ снижался с 25 до 2—4.

Пурпурные серобактерии, относящиеся к строгим анаэробам, развиваются только на средах с добавлением восстановителей, как Na_2S , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ и аскорбиновой кислоты при значении $r\text{H}_2$ среды от 3 до 21. Оптимальный $r\text{H}_2$ для роста пурпурных серобактерий устанавливается ниже 13. Факультативные анаэробные несерные пурпурные бактерии способны развиваться в более широком диапазоне изменения $r\text{H}_2$ от 0.5 до 27. Оптимальный $r\text{H}_2$ для несерных пурпурных бактерий находится в пределах от 25—26.