

铁和镍对光合细菌生长和产氢的影响

杨素萍^{1,2} 赵春贵² 曲音波^{1*} 钱新民¹

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

摘 要 基于金属元素在生物体功能发挥中的作用以及它们参与光合细菌光合放氢的重要性,着重进行了铁和镍对沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*) Z 菌株和一株红杆菌(*Rhodobacter* sp.) 细胞生长、光合放氢和光合色素合成影响的研究。结果表明,高浓度 Fe^{3+} 可显著提高两菌株光放氢能力和生物合成能力,最适浓度的 Fe^{3+} 可使其产氢能力分别达对照组的 1.32 倍和 2.8 倍,产氢得率分别为 360.6 mL/g 和 385.9 mL/g,生物量分别为对照组的 1.42 倍和 1.54 倍。 $9\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} 的添加可使两菌株产氢能力分别达对照组的 1.48 倍和 1.96 倍,产氢得率分别为 429.7 mL/g 和 456.3 mL/g。而当 Ni^{2+} 浓度为 $12\mu\text{mol/L}$ 时,两菌株的产氢活性受到不同程度的抑制,产氢得率分别降低 46.7% 和 19.4%。在铁浓度相同时,添加 $6\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} 能明显促进两菌株的生长。而当 Ni^{2+} 浓度大于 $6\mu\text{mol/L}$ 时,细胞生长受到抑制。 Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 对 *Rhodobacter* sp. 菌株类胡萝卜素色素有显著影响。研究结果显示,426 nm 色素峰随铁浓度的增加和镍的添加而消失,同时,产氢活性提高。

关键词 铁,镍,光合细菌,光合放氢,光合色素

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)02-0257-07

光合细菌可利用体内巧妙的光合机构在降解有机物(有机废水)同时转化太阳能为氢能,被认为是一种能妥善解决能源与环境,促进经济与环境协调发展的绿色技术。近年来,光合细菌光合作用原初光化学反应机理,尤其是光反应中心的研究取得了令人瞩目的成就^[1,2],而依赖光合作用的固氮放氢则有待深入。光合细菌的光合放氢是在光合磷酸化提供能量和有机物降解提供还原力条件下由固氮酶催化完成。在此过程中,铁起着举足轻重的作用,因为与光合放氢有关的电子传递载体(铁氧还蛋白、细胞色素、铁醌)、固氮酶(铁钼蛋白和铁蛋白)、氢酶(NiFe 氢酶、Fe 氢酶)等都需要铁的参与^[3-6]。 Mo^{2+} 作为固氮酶催化活性基团,对光合放氢的影响研究较多^[6]。与钼相比,铁对光合放氢的作用还未引起足够重视。

镍是组成光合细菌 Ni Fe 氢酶、CO 脱氢酶的重要活性基团^[3-5]。镍的研究多集中在对固氮酶和氢酶合成和活性的影响^[7,8],而从细胞生长、产氢和光合色素角度进行的研究还未见系统报道。众所周知,金属离子作为金属酶的活性中心或辅基在生命活动中起至关重要的作用。鉴于铁和镍在氢代谢中的重要地位,本文着重探讨了铁和镍对光合细菌产氢与生长以及光合色素的影响,以为光合细菌的深入研究提供参考。

* 通讯作者。Tel 86-531-8364429; Fax 86-531-8365234; E-mail lifezds@sdu.edu.cn

作者简介 杨素萍(1966-)女,副教授,博士,主要从事光合细菌的研究与应用。E-mail chungui@sxu.edu.cn

收稿日期 2002-07-12,修回日期 2002-10-15

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株为沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*) Z 菌株和一株红杆菌(*Rhodobacter* sp.) 菌株。

1.2 培养基和培养条件

种子培养基和产氢培养基(HM)均采用改良的 Ormerod 培养基^[9],用 2.46 g/L 乙酸钠和 1.0 g/L 谷氨酸钠分别代替取代其中的 6.0 g/L 苹果酸钠和 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。铁测试培养基删去 HM 中的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 EDTA,而代之以终浓度为 0、50、100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 EDTA-Fe 溶液。因 HM 中不含镍,故镍测试培养基是 HM 中分别添加终浓度为 0、3、6、9 和 12 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液。测试浓度的选择是以原有浓度为基础上下选择两个试验点。培养容器采用 130 mL 玻璃盐水瓶,内盛 100 mL 产氢培养基,接种对数期种子液后,用反口橡皮塞密封。接种量为 10%,起始 OD_{660} 为 0.236。培养瓶剩余空间用置换排气法充氩气以保证厌氧环境。将一个无菌 16 # 短针头插入到培养瓶的氩气相中,产生的气体由此通过无菌硅橡胶管进入盛满 0.1 mol/L NaOH 的史氏刻度发酵管中,定时记录产氢量。另外用一个无菌 7 # 长针头插入到培养液的下部以用作接种和取样。光照厌氧培养在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 、5000 lux 条件下。每个处理均作两次重复。所有器皿均用 1 mol/L HCl 浸泡过夜,并以三蒸水冲洗多次,烘干备用。所有的试剂和培养基也用三蒸水配制。所用试剂均为分析纯。

1.3 氢含量测定^[10]

1.4 活细胞吸收光谱和细胞生长的测定^[10]

活细胞吸收光谱的测定是离心收集光照厌氧培养物,经洗涤后悬浮于 60% 的蔗糖溶液中,取 300 μL 于 Spectra Max 190 型微孔板分光光度计上扫描,扫描范围为 190 nm ~ 850 nm。细胞生长是测定波长 660 nm 处的细胞悬液的光密度值。

1.5 谷氨酸含量测定

离心样品,取 25 μL 上清液于 SBA-50B 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所研制)测定谷氨酸含量。样品测定之前,先用浓度为 1.0 g/L (定标为 100%) 的标准 L-谷氨酸进行定标。1.0 g/L 标准 L-谷氨酸定标为 100%。

2 结果

2.1 不同浓度铁对光合放氢的影响

图 1 和图 2 表明, Fe^{3+} 对 *R. palustris* Z 菌株光合放氢影响程度较小,但产氢能力仍呈现出随 Fe^{3+} 浓度增加而增加的趋势,添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 可明显提高其产氢能力,产氢得率为 360.6 mL/g 乙酸,为对照组的 1.32 倍。 Fe^{3+} 可显著提高 *Rhodobacter* sp. 菌株产氢能力,150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 可使其产氢能力达对照组的 2.8 倍,产氢得率为 385.9 mL/g 乙酸。200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 并未成为两菌株产氢限制性条件。在适宜条件下,*Rhodobacter* sp. 菌株的产氢能力高于 *R. palustris* Z 菌株。两菌株在高浓度含铁水体中产生分子氢的特性具有重要应用价值。

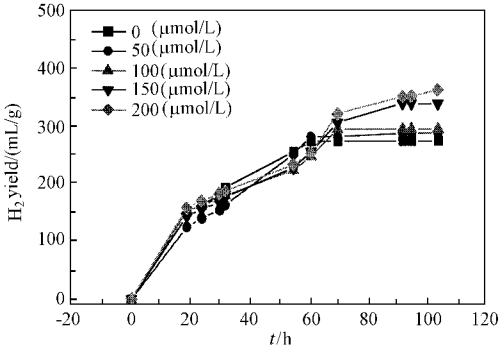


图1 Fe^{3+} 对 *R. palustris* Z 菌株产氢的影响

Fig.1 Effect of Fe^{3+} on hydrogen production of *R. palustris* Z

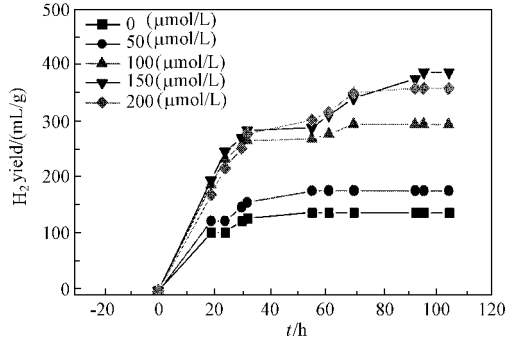


图2 Fe^{3+} 对 *Rhodobacter* sp. 菌株产氢的影响

Fig.2 Effect of Fe^{3+} on hydrogen production of *Rhodobacter* sp.

2.2 不同浓度镍对光合放氢的影响

图3和图4表明,添加适量 Ni^{2+} 可显著提高两菌株产氢能力。当 Ni^{2+} 浓度为 $9\mu\text{mol/L}$ 时, *R. palustris* Z 和 *Rhodobacter* sp. 两菌株最高产氢得率分别为 429.7 mL/g 乙酸和 456.3 mL/g 乙酸, 分别比对照组提高 1.48 倍和 1.96 倍。 *R. palustris* Z 菌株产氢适宜 Ni^{2+} 浓度范围为 $3\sim 9\mu\text{mol/L}$, 当 Ni^{2+} 浓度为 $12\mu\text{mol/L}$ 时, 产氢活性明显受到抑制, 不仅产氢延滞期延长, 产氢得率也下降 46.7%。 *Rhodobacter* sp. 菌株产氢适宜 Ni^{2+} 浓度范围为 $6\sim 9\mu\text{mol/L}$, 当 Ni^{2+} 浓度为 $12\mu\text{mol/L}$ 时, 产氢量降低 19.4%, 但仍高于 $0\sim 3\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} 浓度时的产氢量。

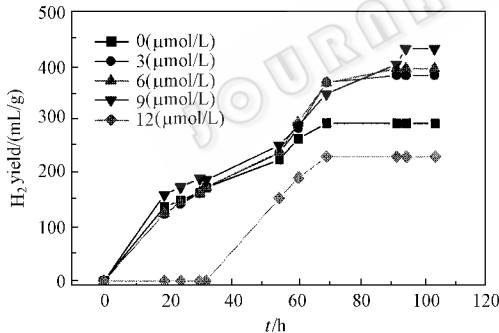


图3 Ni^{2+} 对 *R. palustris* Z 菌株产氢的影响

Fig.3 Effect of Ni^{2+} on hydrogen production of *R. palustris* Z

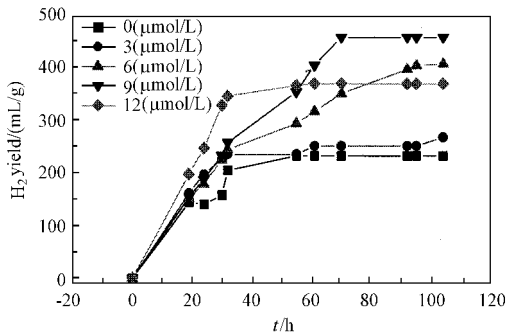


图4 Ni^{2+} 对 *Rhodobacter* sp. 菌株产氢的影响

Fig.4 Effect of Ni^{2+} on hydrogen production of *Rhodobacter* sp.

2.3 铁和镍对细胞生长的影响

图5结果表明, Fe^{3+} 的添加明显刺激两菌株的生长。 $100\mu\text{mol/L}$ 和 $150\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 使 *R. palustris* Z 菌株和 *Rhodobacter* sp. 菌株生物量分别达对照组的 1.42 倍和 1.54 倍。在 Fe^{3+} 浓度为 $150\mu\text{mol/L}$ 时, *Rhodobacter* sp. 菌株的生物量是 *R. palustris* Z 菌株的 1.3 倍。

添加 $6\mu\text{mol/L}$ 的 Ni^{2+} 明显刺激 *R. palustris* Z 菌株和 *Rhodobacter* sp. 菌株的生长(图6) 其生物量分别可达对照组的 1.48 倍和 1.39 倍。当 Ni^{2+} 浓度在 $0\sim 6\mu\text{mol/L}$ 之间时, 细胞生物量随 Ni^{2+} 浓度的增加而增加。大于 $9\mu\text{mol/L}$ 的 Ni^{2+} 对生长具有负效应。从图1~图6综合分析, 可得出如下结论 (1) *Rhodobacter* sp. 菌株的产氢能力和生物量均高于

R. palustris Z 菌株。(2) 适量 Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 的添加可显著促进细胞生长和产氢,但促生长和促放氢所需的最适添加量不同。

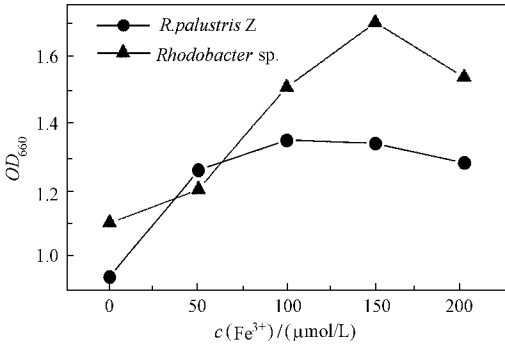


图 5 Fe^{3+} 对 *R. palustris* Z 和 *Rhodobacter* sp. 菌株生长的影响

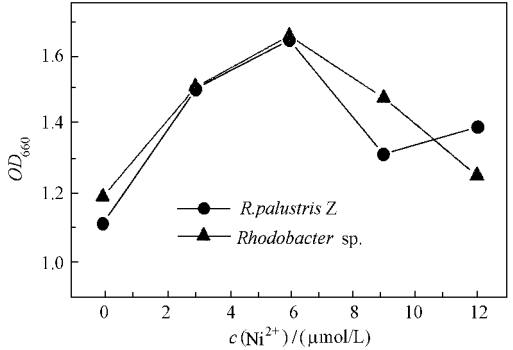


图 6 Ni^{2+} 对 *R. palustris* Z 和 *Rhodobacter* sp. 菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of Fe^{3+} on cell growth of *R. palustris* Z and *Rhodobacter* sp.

Fig. 6 Effect of Ni^{2+} on cell growth of *R. palustris* Z and *Rhodobacter* sp.

2.4 两菌株对谷氨酸的利用

对产氢结束后上清液谷氨酸测定,结果表明,100 ~ 200 $\mu mol/L$ 浓度的铁有助于谷氨酸的吸收利用。*R. palustris* Z 菌株的谷氨酸的利用率受铁浓度影响较小,仅对照组和 50 $\mu mol/L$ 的 Fe^{3+} 培养液检测到少量谷氨酸,故该菌株在 0 ~ 200 $\mu mol/L$ 的 Fe^{3+} 浓度范围内,表现出较高的产氢活性(图 1),细胞生物量也在 100 $\mu mol/L$ Fe^{3+} 浓度时达到峰值(图 5)。而 *Rhodobacter* sp. 菌株在 0 ~ 50 $\mu mol/L$ 铁浓度的细胞培养液中仍含有 9% ~ 15% 的谷氨酸,故该浓度下细胞产氢活性低的原因可能是由于谷氨酸过量的缘故,谷氨酸很可能脱氨基产生 NH_4^+ 抑制了光合放氢活性,当铁浓度大于 100 $\mu mol/L$,由于谷氨酸完全被消耗,故产氢活性明显提高(图 2)。

在不含 Ni^{2+} 的反应体系中,*R. palustris* Z 菌株能完全利用谷氨酸,而 *Rhodobacter* sp. 菌株谷氨酸利用率仅为 92%,培养基中仍含有 8% 的谷氨酸未被利用,这可能是 *Rhodobacter* sp. 菌株在无 Ni^{2+} 培养基中产氢能力(232.32 mL/g 乙酸)低于 *R. palustris* Z 菌株(291.26 mL/g 乙酸)的主要缘故(图 3 和图 4)。在添加 Ni^{2+} 的反应体系中,两菌株均可完全利用谷氨酸,由此可见, Ni^{2+} 的添加在某种程度上有利于两菌株对谷氨酸的吸收利用(表 1)。

表 1 铁和镍对 *R. palustris* Z 和 *Rhodobacter* sp. 菌株谷氨酸利用的影响 (%)

Table 1 Effects of Fe^{3+} and Ni^{2+} on glutamate utilization (%) of *R. palustris* Z and *Rhodobacter* sp.

	$c(Fe^{3+}) / (\mu mol/L)$					$c(Ni^{2+}) / (\mu mol/L)$				
	0	50	100	150	200	0	3	6	9	12
<i>R. palustris</i> Z	94	98	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Rhodobacter</i> sp.	85	91	100	100	100	92	100	100	100	100

2.5 铁和镍对光合色素的影响

图 7 结果表明, Fe^{3+} 对 *Rhodobacter sp.* 菌株光合色素的影响程度大于 *R. palustris Z* 菌株, 尤其是类胡萝卜素。当 Fe^{3+} 添加量为 50 ~ 150 $\mu\text{mol/L}$, *R. palustris Z* 菌株 468、500 和 534 nm 处的正常的螺菌黄质系类胡萝卜素吸收峰比较明显。而 *Rhodobacter sp.* 菌株类胡萝卜素合成比较复杂, 426、455、482 和 514nm 处的吸收峰表明该菌株含有球形烯(spheroidene) (429nm 455nm 487nm) 和球状菌素(spheroidenone) (456nm ~ 460nm 481nm ~ 484nm, 512nm ~ 517nm) 系列的类胡萝卜素, 与文献报道明显不同^[11, 12]。有趣的是, 426nm 处的类胡萝卜素吸收峰随 Fe^{3+} 浓度的升高而降低, 当 Fe^{3+} 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 该色素峰消失, 但产氢量却随 Fe^{3+} 浓度的增加而增加。从类胡萝卜素合成途径分析^[6, 12], 铁并不参与其合成, 那么, 铁有可能是作为一种重要的调控因子调节类胡萝卜素的合成。*Rhodobacter sp.* 菌株 426 nm 吸收峰的出现与消失现象也证明了这一点。

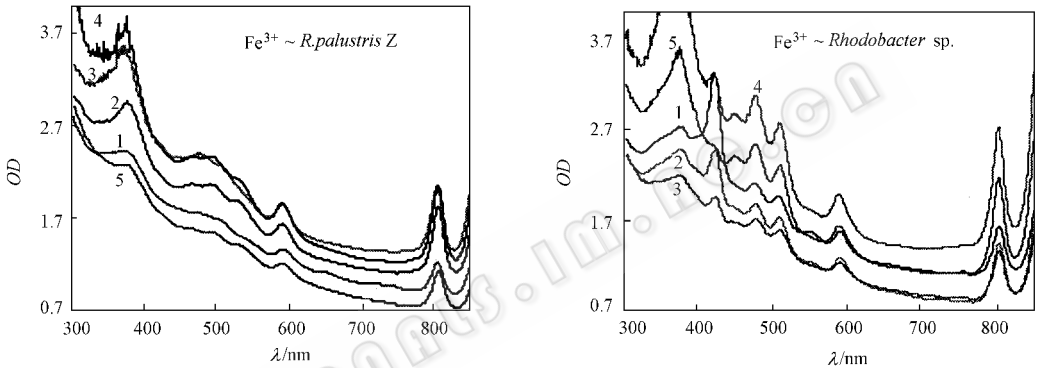


图 7 Fe^{3+} 对 *R. palustris Z* 和 *Rhodobacter sp.* 菌株光合色素的影响

Fig.7 Effect of Fe^{3+} on photopigment of *R. palustris Z* and *Rhodobacter sp.*

1 2 3 4 and 5 represent concentrations of Fe^{3+} of 0, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Ni^{2+} 对两菌株类胡萝卜素影响程度也存在差异(图 8)。 *R. palustris Z* 菌株类胡萝卜素峰高随 Ni^{2+} 浓度增加而增加。同样有趣的是, *Rhodobacter sp.* 菌株对 Ni^{2+} 也作出特殊反应, 当培养基中不添加 Ni^{2+} 时, 426 nm 吸收峰出现, 与添加高浓度 Fe^{3+} 反应相同, 培养基中一旦添加 Ni^{2+} , 426 nm 吸收峰即消失。由此看来, 铁和镍对 426nm 吸收峰可能有特定调控作用, 426 nm 处光合色素的合成将抑制细胞产氢活性。高浓度铁和镍的添加引起细胞产氢活性的提高可能是由于抑制了该色素基因的表达。

3 讨 论

研究表明, 铁和镍对光合细菌光合放氢有显著影响。 *R. palustris* 菌株光合放氢对铁的需求量较低, 但高浓度的铁(200 $\mu\text{mol/L}$)可提高其产氢能力。 *Rhodobacter sp.* 菌株光合放氢至少应添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的铁。曾有文献报道^[13], 培养基中添加铁可提高非共生固氮菌的固氮酶活性。固氮现象普遍存在于紫色非硫细菌类群中, 光合放氢又由固氮酶催化, 由此推断, 高浓度铁很可能是通过提高固氮酶活性而增加产氢量。如果从固氮酶组成分析, 该结论也比较客观。

镍对光合放氢起何作用? 杨大庆^[7]认为, *Rhodobacter sphaeroides* 601 菌株在以谷氨酸

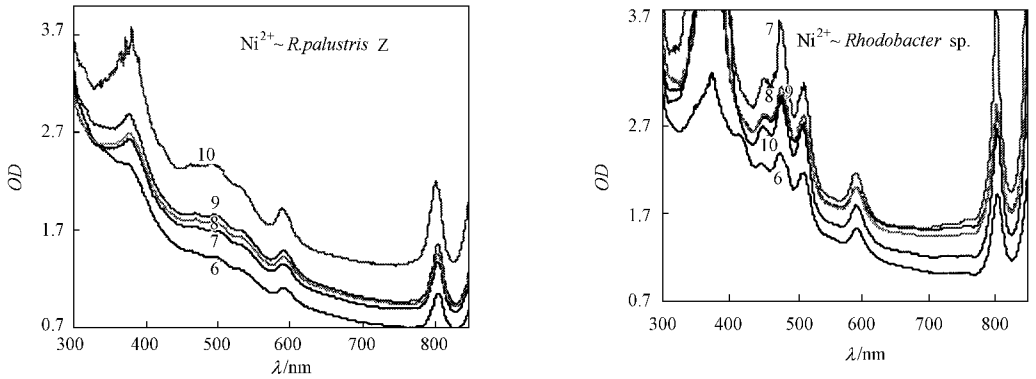


图 8 Ni^{2+} 对 *R. palustris* Z 和 *Rhodobacter* sp. 菌株光合色素的影响

Fig. 8 Effect of Ni^{2+} on photopigment of *R. palustris* Z and *Rhodobacter* sp.

6, 7, 8, 9 and 10 represent concentrations of Ni^{2+} of 0, 3, 6, 9 and 12 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

为氮源时, $10\mu\text{mol/L}$ 的镍可提高氢酶活性而抑制光放氢作用, 但固氮酶活性却不受影响。朱长喜报道与此存在差异^[8], 他们对 *R. capsulata* N3 菌株研究发现, 镍在成倍提高氢酶吸氢活性的同时, 固氮酶活性也成倍提高。我们研究发现, Ni^{2+} 引起产氢能力的提高并无种间差异。镍是构成氢酶的活性中心成分, 氢酶的吸氢支持固氮酶活性只发生在电子供体缺乏条件下。此时, 放氢量应有表观上的减少, 但本研究并无此现象。如果镍参与构成氢酶组成, 该结果提示, 这种氢酶主要执行放氢功能。分析相同镍浓度下细胞生长和产氢关系发现, Ni^{2+} 具有调节还原力在生长和产氢之间分配的作用。

光合细菌光合放氢需要的能量来自光合作用, 光合色素是光合作用的主要功能单位, 所以, 光合色素的组成和含量在某种程度上影响光放氢效率。本研究发现, 高浓度 Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 对类胡萝卜素的合成有重要影响, 尤其是 *Rhodobacter* sp. 菌株。426 nm 类胡萝卜素吸收峰在高浓度铁和添加镍条件下消失的同时可引起的产氢活性提高, 对其进行深入研究, 可望加深我们对光合放氢机理的认识。

参 考 文 献

- [1] Stonell M H B, McPhillips T M, Rees D C, et al. Light induced structural changes and the mechanism of electron/proton transfer in the photosynthetic reaction center. *Science*, 1997, **276**: 812 ~ 816.
- [2] Abrensch E C, Paddock M L, Stonell M H B. Identification of proton transfer pathways in the X-ray crystal structure of the bacterial reaction center from *R. sphaeroides*. *Photosyn Res*, 1998, **55**: 119.
- [3] Volbeda A, Charon M H, Piras C, et al. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 1995, **373**: 580 ~ 587.
- [4] Peters J W, Lanzolotta W N, Lemon B J, et al. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 1998, **282**, 1853 ~ 1858.
- [5] Tommasi I, Aresta M, Giannoccaro P, et al. Bioinorganic chemistry of nickel and carbon dioxide: an Ni complex behaving as a model system for carbon monoxide dehydrogenase enzyme. *Inorganica Chimica Acta*, 1998, **272**: 38 ~ 42.
- [6] 朱章玉, 俞吉安, 林志新, 等. 光合细菌的研究及其应用. 上海: 上海交通大学出版社, 1991. 141 ~ 162.
- [7] 杨大庆. 镍在浮球红假单胞菌氢酶合成中的作用. 植物生理学通讯, 1990, **6**: 36 ~ 38.
- [8] 朱长喜, 陈秉俭, 宋鸿遇. 镍对荚膜红假单胞菌氢酶和固氮酶活性的促进作用. 微生物学报, 1987, **27**(1): 52.

~ 56.

- [9] Ormerod J G , Ormerod K S , Gest H. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria ; relationships with nitrogen metabolism *Arch Biochem Biophys* , 1961 , **94** : 449.
- [10] 杨素萍 , 赵春贵 , 曲音波 , 等. 沼泽红假单胞菌乙酸光合放氢研究. *生物工程学报* , 2002 , **18**(4) : 486 ~ 491.
- [11] 平山修. 光合成细菌の色素. *发酵と工业* , 1978 , **36**(7) : 563 ~ 573.
- [12] Jensen L S. Carotenoids of photosynthetic bacteria - distribution , structure and biosynthesis. In : Gest H , Sanpietro A , Veenon L P , ed. *Bacterial Photosynthesis*. Yellow Springs , Ohio : Antionch Press , 1963. 19 ~ 34.
- [13] 方 萍 , Omar A M N. 培养基铁浓度对不同非共生固氮菌株与小麦基因型联合固氮效率的影响. *浙江农业大学学报* , 1997 , **23**(6) : 716 ~ 720.

Effects of Iron and Nickel on Hydrogen Photoevolution , Cell Growth , and Photosynthetic Pigment of Photosynthetic Bacteria

Yang Suping^{1,2} Zhao Chungui² Qu Yinbo^{1*} Qian Xinmin¹

(¹ State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

(² School of Life Science and Technology , Shanxi University , Taiyuan 030006 , China)

Abstract : The influences of metal ions of Fe^{3+} and Ni^{2+} on H_2 productivity , cell growth and photosynthetic pigment in *Rhodospseudomonas palustris* Z strain and *Rhodobacter* sp. were investigated. The results showed that the addition of the optimal concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} to the medium could enhance H_2 productivity and cell growth remarkably. Metal ions of Fe^{3+} and Ni^{2+} had strong influence on photosynthetic pigments. The optimal concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} for H_2 production in *R. palustris* Z strain lay in the range of 150 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ and 3 ~ 9 $\mu\text{mol/L}$, the highest H_2 yield was 360.6 mL/g and 429.7 mL/g , which was 1.32-fold and 1.48-fold comparing with the control , respectively. The optimal concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} for cell growth were 100 $\mu\text{mol/L}$ and 6 $\mu\text{mol/L}$, respectively. For *Rhodobacter* sp. , the optimal concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} for H_2 evolution were 150 $\mu\text{mol/L}$ and 9 $\mu\text{mol/L}$, the maximal H_2 yield of 385.9 mL/g and 456.3 mL/g were obtained , which was 2.8-fold and 1.96-fold comparing with the control , respectively. Cell growth could be stimulated by adding 150 $\mu\text{mol/L}$ of Fe^{3+} and 6 $\mu\text{mol/L}$ of Ni^{2+} to medium , which was 1.54-fold and 1.39-fold comparing with the control. The relationship between H_2 productivity and the appearance or disappearance of 426 nm absorption peak by adding higher concentration of Fe^{3+} and Ni^{2+} to the medium revealed that the photosynthetic pigment of 426nm may plays an important role in H_2 photoevolution.

Key words : Iron , Nickel , Photosynthetic bacteria , H_2 production , Photosynthetic pigment

* Corresponding author. Tel 86-531-8364429 ; Fax 86-531-8365234 ; E-mail : lifezds@sdu.edu.cn