

绿色红假单胞菌和绿硫红假单胞菌的分离与鉴定

杨素萍 张肇铭

(山西大学生命科学系 太原 030006)

赵春贵

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

摘要 在选择培养条件下,利用琼脂振荡稀释分离技术,对接种于造纸废水和污水处理厂污泥污水的富集培养液进行纯化,分离得到两株绿色的光合细菌菌株 G 和 SG。它们细胞内均含细菌叶绿素 b,光合内膜结构为片层,繁殖方式为出芽,但在对有机碳源、还原态硫化物利用能力及同化硫酸盐等生理特性上有很大差异。经鉴定,以《伯杰氏系统细菌学手册》第 3 卷(1989)为依据,确定这两菌株是红假单胞菌属的两个种,菌株 G 定名为绿色红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas viridis*),菌株 SG 定名为绿硫红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas sulfoviridis*)。

关键词 紫色非硫细菌,红假单胞菌属,硫化物

光合细菌尤其是紫色非硫细菌类群因其既可于光照厌氧条件下进行光合作用,又可用于黑暗好氧或微好氧条件下生长的特性,已被广泛应用于处理各种高浓度有机废水的研究中。为了获得一批优良生产菌株,作者从不同废水中分离筛选具不同特性的光合细菌菌株,其中从造纸废水及污水处理厂的污水污泥中分离获得两株绿色的光合细菌,对其纯培养物进行形态观察、生理生化特性研究及 DNA G+C 含量测定,鉴定是两个种,其中一种能耐 1.5 mmol/L 的硫化物。关于这两个种的分离鉴定,在国内还未见报道。现将鉴定结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

菌株 G 取自太原市殷家堡污水处理厂二级沉淀池的污泥和一级处理的污水。菌株 SG 来源于山西临猗造纸厂的废水排出处,废水含有一定浓度的硫化物。*Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17023 来自美国。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 富集培养基:采用 Ormerod 培养基^[1],其中的维生素溶液^[2]和微量元素溶液^[3]稍

加变更。按分离目的还加入硫化物。

1.2.2 分离培养基: 富集培养基加入 0.8% 的琼脂制成半固体培养基分装于试管或培养皿中。

1.2.3 培养条件: 光照厌氧培养, 以配有橡皮塞的生理盐水瓶或螺口试管作培养容器。光照强度 2000 lx, 温度 30℃。黑暗好氧或微好氧培养按 Pfennig 方法^[1]。

1.3 分离纯化

采用 Biebl 和 Pfennig 琼脂振荡稀释法^[3]。平板稀释法是将制备好的培养皿置于放有焦性没食子酸和碳酸钠的干燥器抽真空充氩气 3 次以保证厌氧环境。

1.4 形态观察

厌氧载片培养按 Whittenbury 方法^[5], 在相差显微镜下观察活细胞形态, 并进行纯度检验。

用电镜确定个体形态、繁殖方式及光合内膜结构类型。

1.5 活细胞吸收光谱的测定

光照厌氧培养物经离心、洗涤后, 悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 于岛津 UV-Vis-近红外 365 型分光光度计上扫描, 扫描范围 300—1500 nm。

1.6 生理特性鉴定

生长因子需求及对有机碳源利用试验按文献[6]。测定是以生物素、硫胺素、菸酸、对氨基苯甲酸及酵母膏的不同组合取代维生素溶液。生长测定是于国产 752-型紫外可见分光光度计上测其培养一周后的 650 nm 处的 OD 值。

硫化物无机电子供体利用能力试验采用文献[7]的方法。酵母膏最终浓度为 0.01%, 碳酸氢盐最终浓度 0.1%。硫化物测定浓度范围 0—2 mmol/L。

硫酸盐的同化是先在无硫培养基中培养 3 天, 然后再接种于含硫酸盐 0.5 mmol/L 的培养基光照厌氧培养, 定时进行生长测定。

1.7 DNA 的分离纯化和 G+C 含量的测定

DNA 的分离纯化采用 Marmur^[6] 和林万明^[9]相结合的方法。

DNA G+C 含量的测定采用热变性温度法。

2 结果

2.1 形态和培养特征

两菌株均为革兰氏阴性细菌。光合内膜结构类型都呈片层状, 位于细胞质膜下并与其平行(图 1—2)。菌株 G 单个细胞为杆状至卵圆, 0.6—0.7×1.0—2.0 μm, 靠极生鞭毛运动, 繁殖方式为出芽生殖(图 3)。菌株 SG 单个细胞也为杆状至卵圆, 0.7—0.8×1.2—2.2 μm, 靠亚极生鞭毛运动, 行出芽方式的繁殖(图 4)。

在试管半固体培养基中, 菌株 G 菌落为黄绿色, 呈透镜形, 直径 1—2 mm, 边缘整齐。菌株 SG 菌落为绿色, 在平皿培养基中呈圆形, 表面突起, 边缘规则, 光滑湿润, 直径约 3 mm。

在光照厌氧培养条件下, 菌株 G 培养液初为黄绿色, 老培养物变为绿色。菌株 SG 细胞悬液为绿色。在黑暗好氧或微好氧条件下, 菌株 G 和 SG 培养液颜色分别为淡黄绿色

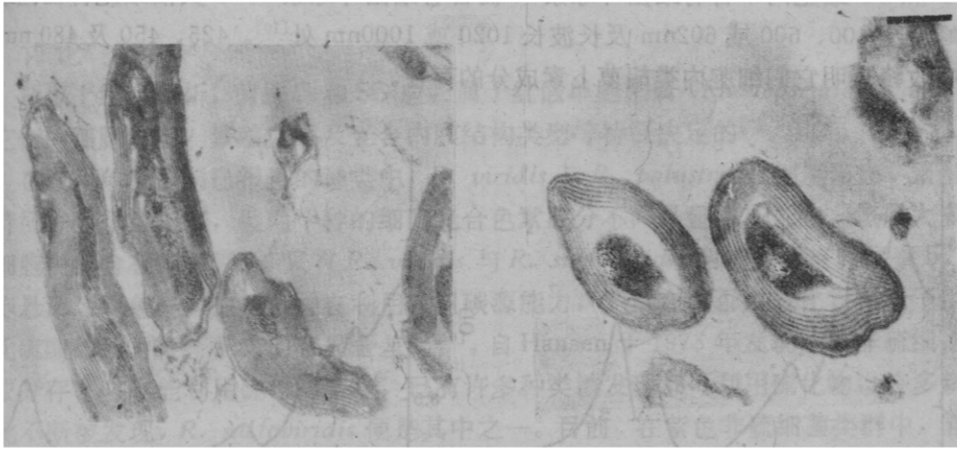


图1 *Rhodopseudomonas sulfoviridis* SG 的光合内膜 (2700×)

Fig.1 Ultrathin section of *Rhodopseudomonas sulfoviridis* SG showing photosynthetic intracytoplasmic membrane



图2 *Rhodopseudomonas viridis* G 的光合内膜 (3400×)

Fig.2 Ultrathin section of *Rhodopseudomonas viridis* G showing photosynthetic intracytoplasmic membrane

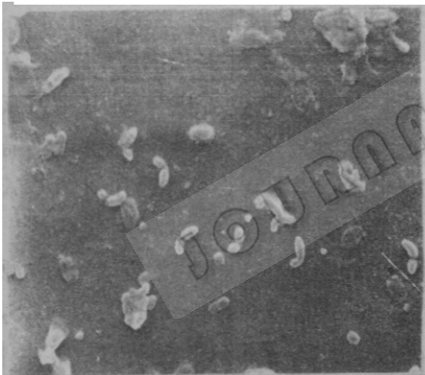


图3 *Rhodopseudomonas viridis* G 的细胞形态及分裂方式 (3200×)

Fig.3 Electronic scanning micrograph of *Rhodopseudomonas viridis* G indicating cell shape and division mode



图4 *Rhodopseudomonas sulfoviridis* SG 的细胞形态及分裂方式 (3200×)

Fig.4 Electronic scanning micrograph of *Rhodopseudomonas sulfoviridis* SG indicating cell shape and division mode

和淡绿色。

2.2 色素成分

以球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 17023 (美国 ATCC 提供) 标准菌株作对照样品, 测得菌株 17023、G 和 SG 活细胞吸收光谱见图 5—7。结果表明, 17023 菌株细胞内只含有细菌叶绿素 a^[10], 其活细胞特征性最大吸收峰在 375、590、830 及 890nm 处, 而

菌株 G 和 SG 细胞内不含有细菌叶绿素 a, 而含有细菌叶绿素 b^[10], 其活细胞特征性最大吸收峰位于 400、600 或 602nm 及长波长 1020 或 1000nm 处^[10]。425、450 及 480 nm 附近的吸收峰表明它们细胞内类胡萝卜素成分的存在。

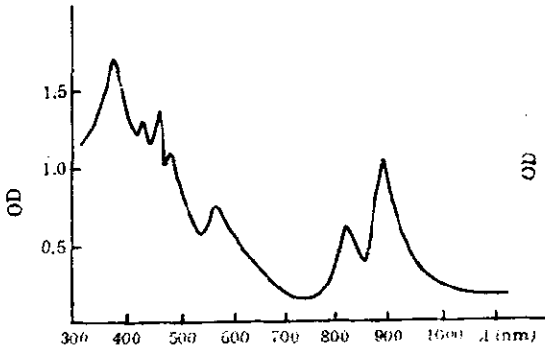


图 5 菌株 17023 活细胞吸收光谱
Fig. 5 Absorption spectrum of live cell suspension of strain 17023

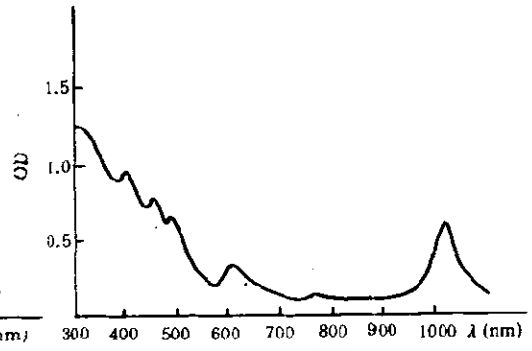


图 6 菌株 G 活细胞吸收光谱
Fig. 6 Absorption spectrum of live cell suspension of strain G

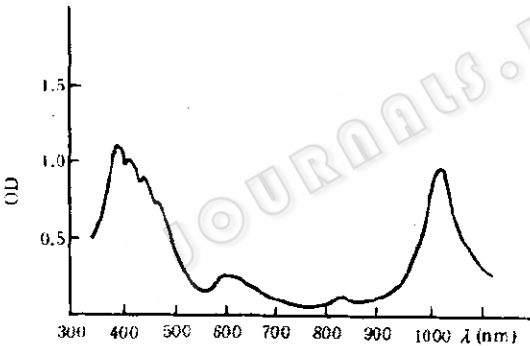


图 7 菌株 SG 活细胞吸收光谱
Fig. 7 Absorption spectrum of live cell suspension of strain SG

2.3 生理特性

两菌株在对生长因子需求、有机碳源及硫化物电子供体利用能力方面表现出较大差异。菌株 G 生长不需要维生素、酵母膏、生物素和对氨基苯甲酸刺激其生长。不能利用葡萄糖、果糖、甘油、丙烯醇和甘露醇作碳源基质, 也不能以 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 作光合电子供体行光自养生长, 0.5mmol/L 的硫化物即抑制其生长。但它具有同化硫酸盐的能力。而菌株 SG 的生长需以酵母膏作生长因子, 除能利用低分子有机酸外, 也能很好利用葡萄糖、果糖、甘油、山梨醇及丙烯醇等碳源物质。尤其与 G 菌株不同的是 SG 菌株对硫化物有较高耐受能力, 可在含 1.5 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 培养基中生长。但不具有同化硫酸盐的能力。

铵盐是两菌株很好生长的氮源, 酪蛋白水解物明显刺激其生长。

2.4 DNA G+C 含量

根据热变性温度法, 从热变性曲线上求得菌株 G DNA G+C 含量为 68.7 mol%, SG 菌株为 68.2mol%。

3 讨论

从以上结果分析, 菌株 G 和 SG 应归属于红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*), 这是由它们的细胞形态、繁殖方式及光合内膜结构类型等特征决定的^[7]。

在红假单胞菌属已报道的种类中, *R. viridis* 与 *R. palustris* 在细胞形态、繁殖方式等特征方面非常相似, 但两个种的细胞光合色素成分不同是显而易见的。该属大多数种类细胞内都含有叶绿素 a, 只有 *R. viridis* 与 *R. sulfoviridis* 两个种含有叶绿素 b, 使得细胞悬液为绿色。但这两个种在利用有机碳源能力, 尤其在能否以硫化物作电子供体和同化硫酸盐能力等特征方面有显著差异^[10]。自 Hansen 于 1973 年发现紫色非硫细菌在某些成分存在时也能利用硫化物至今, 已有许多种类被发现都可利用硫化物, 许多新种也由此不断被发现, *R. sulfoviridis* 便是其中之一。目前, 在紫色非硫细菌类群中, 能否利用硫化物已作为分类中的一个鉴定特征。

本文报道的菌株 G 与 *R. viridis*^[11], 菌株 SG 与 *R. sulfoviridis*^[12] 虽然在生长因子需求上有所不同, 但在细胞形态、繁殖方式、光合内膜结构类型、利用碳源及硫化物电子供体、同化硫酸盐、DNA G+C 含量等特征方面却都非常相似, 根据《伯杰氏系统细菌学手册》第 3 卷 (1989) 及有关资料, 确定这两个菌株是两个种, 菌株 G 命名为绿色红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas viridis*), 菌株 SG 命名为绿硫红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas sulfoviridis*)。

致谢 本文承山西省生物研究所袁长芳同志协助测定 DNA G+C 含量; 核工业部第七研究所电镜室赖炽香同志协助扫描电镜照片和超薄切片电镜照片的制作和拍摄, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Ormerod T G, Ormerod K S, Gest H. *Arch Biochem Biophys*, 1961, **94**: 449—463.
- [2] Kato S I, Urakami T, Komagata K. *J Gen Appl Microbiol*, 1985, **31**: 381—389.
- [3] Pfennig N, Trüper H G. Isolation of Members of the Families Chrematiaceae and Chlorobiaceae. In: Starr M P *et al* ed. *The Prokaryotes*. Springer-verlag Berlin Heidelberg Printed in the U. S. A, 1981. 282—284.
- [4] Pfennig N. *J Bacteriol*, 1969, **99**: 591—602.
- [5] Whittenbury R, Mclellan A G. *Arch Mikrobiol*, 1967, **59**: 324—334.
- [6] 张肇铭, 邓松录, 赵良启, 等. 山西大学学报, 1984, **4**: 53—59.
- [7] 张肇铭, 杨素萍, 赵春贵. 山西大学学报, 1992, **15**: 379—385.
- [8] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, **3**: 208—218.
- [9] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 北京: 科学出版社, 1989. 48—58.
- [10] Imhoff J F, Trüper H G. Purple Nonsulfur Bacteria. In: Krieg N R ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1989. 1672—1676.
- [11] Drews G, Giesbrecht P. *Arch Mikrobiol*, 1966, **53**: 255—262.
- [12] Keppen O I. *Микробиология*, 1975, **2**: 258—263.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION
OF *RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS*
AND *RHODOPSEUDOMONAS*
*SULFOVIRIDIS***

Yang Suping Zhang Zhaoming

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Zhao Chungui

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract Under selective culture conditions, two pure cultures (strain G and strain SG) of the purple nonsulfur photosynthetic bacteria containing bacteriochlorophyll b were isolated from pulp effluent and sludge of sewage treatment plant by means of agar shake dilution. Although the cells of strain G and strain SG contained bacteriochlorophyll b and carotenoids, intra-cytoplasmic membranes were of lamellar type parallel to cytoplasmic membrane, the two strains differ in using various organic carbon sources, depending on reduced sulfur compounds and assimilate sulfate. According to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3, strain G was identified to be *Rhodopseudomonas viridis*, strain SG was identified to be *Rhodopseudomonas sulfoviridis*.

Key words Purple nonsulfur bacteria, *Rhodopseudomonas*, Sulfur compounds