

光合细菌产氢研究(二)

—用苹果酸和丁酸筛选产氢光合细菌

毛醒一

三宅淳

川村杉生

(无锡轻工业学院发酵系)

(日本, 通产省, 工技院, 微工所)

一、前 言

为使光合细菌产氢能在工业上应用, 必须提高产氢速度, 为此需要分离出产氢速度高的光合细菌。有关单位已进行这方面工作^[1,2], 但分离方法尚没有系统研究。本试验主要研究筛选过程中氮源对分离细菌产氢速度的影响。结论是: 在 N_2 中光照下增殖培养; 在含 NH_4^+ 的琼脂平板上好气、黑暗条件下分离培养。分离出的百余株菌种其产氢速度如图 1。

将光合细菌和嫌气性细菌混合以增加产氢速度和扩大作用基质。而为了和 *Clostridium butyricum* 混合, 光合细菌必须有利用丁酸产氢的能力^[3], 经筛选找到了利用丁酸的光合细菌, 并比较了用丁酸和苹果酸分离出的细菌从丁酸产氢的能力。

二、材 料 和 方 法

1. 试样来源

采集日本筑波地区沟池泥水样品 13 个。

2. 培养基

1) 基础培养基 见《无锡轻工业学院学报》“光合细菌和梭状菌混合从葡萄糖产氢的研究”(1984 年第四期)。

2) 增殖培养基和分离培养基 含氮培养基 1) 苹果酸为碳源“aM”。基础培养基加 50 mM 苹果酸, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, pH=7。2) 丁酸为碳源“aBy”。基础培养基加 50mM 丁酸, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% 酵母膏, 0.1% $NaHCO_3$, pH=7。不含氮培养基 1) 苹果酸为碳源“M”。基础培养基加 50mM 苹果酸, pH=7。2) 丁酸为碳源“B”。基础培养基加 50mM 丁酸, 0.1% $NaHCO_3$, pH=7。前培养基 1) 苹果酸为碳源“aM”。2) 丁酸为碳源“aBy”。产氢培养基。1) 苹果酸为碳源“gM”。基础培养基加 50mM 苹果酸, 10mM 谷氨酸盐, pH=7。2) 丁酸为碳源“gB”。基础培养基加 50mM 丁酸, 10mM 谷氨酸盐, 0.1% $NaHCO_3$, pH=7。增殖培养 在 N_2 中增殖培养。扁平培养瓶中加入 30ml 不含氮源的“M”培养基和 10ml 试样, 放入聚丙烯酸脂的透明干燥器中, 干燥器中的空气用真空泵抽出, 换成 1 atm 混合气体(90% N_2 , 10% CO_2), 于 1—3 Klux 光照下 30°C 培养 10 天。在含 NH_4^+ 培养基中

本文 1984 年 9 月 5 日收到。

增殖培养 有盖的试管中加入 10ml 含“aM”或“aBy”培养基和 2—5 ml 试样, 培养基表面加入 10ml 液体石蜡, 于 1—3 Klux 光照下 30°C 培养 10 天。平板培养 将上述两种增殖培养液稀释 $10^6 \sim 10^8$ 倍, 取稀释液 30 μ l 分别涂布于两组琼脂平板上, 一组为不含氮源的“M”或“B”, 另一组为含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的“aM”或“aBy”。不含氮源的平板放在上述聚丙烯酸脂的干燥器中于 1 Klux 光照下 30°C 培养 14 天。含 NH_4 的平板则在好气、黑暗条件下 30°C 培养 14 天。分别挑取上述两种平板上的菌落至“aM”或“aBy”试管培养基中, 1 Klux, 30°C 培养后待用。

3. 产氢试验

1) 前培养 取分离菌株的试管培养液 3ml 接入含 25ml “aM”或“aBy”培养基的透明聚脂离心管中, 用液体石蜡封液面, 1 Klux, 30°C 培养 3 天。

2) 产氢 将前培养所得的菌液离心分离(5000 RPM, 8s)所得菌体悬浮于“gM”或“gB”培养基中(在 70ml 扁平瓶内), 悬浊液的光密度 OD_{660} 为 1.0 左右, 用液体石蜡封液面, 10 Klux, 30°C 培养 2~4 天, 产生的氢气用排水法收集。

4. 分析方法

见《无锡轻工业学院学报》“光合细菌和梭状菌混合从葡萄糖产氢的研究”, (1984 年第四期)

三、结果与讨论

1. 氮源对分离细菌数量及产氢速度的影响

以苹果酸为碳源时, 不同氮源的分离方法其产氢速度的分配梯度不同, 但随产氢速度增加而菌株数减少(见图 1)。增殖培养用 N_2 分离得到的菌株其产氢速度比用 NH_4^+ 分离的菌株为高, 光合细菌生长要快, 非光合细菌的污染也少。但当用琼脂平板分离培养时, 在 N_2 中光照下反而比用 NH_4^+ 好气, 黑暗条件下产氢速度低, 细菌生长也弱, 还需真空泵进行气体交换操作易污染(见表 1)。

表 1 不同氮源对分离光合细菌生长情况的影响

分离方法	平板上菌落数	生长情况	分离数	试管液体培养生长数
NN	++	++*	27	22
NA	+++	+++	67	41
AN	++	+*	32	8
AA	+++	++	70	30

* 污染霉菌。

2. 分离光合细菌所用碳源(丁酸和苹果酸)的比较

采用增殖培养用 N_2 , 平板分离用 NH_4^+ 的方法, 分别用丁酸和苹果酸分离得到的菌株, 将其中产氢能力大于 $4 \mu\text{l}/\text{h}/\text{ml}/\text{OD}$ 的菌株再次纯化分离, 然后用丁酸进行产氢试验比较。结果两种碳源分离的菌株产氢速度没有明显差别。(图 2 (2)(3))但经过第二次分离筛选获得的纯化菌株, 产氢速度的梯度有提高。(图 2 (1)(2))

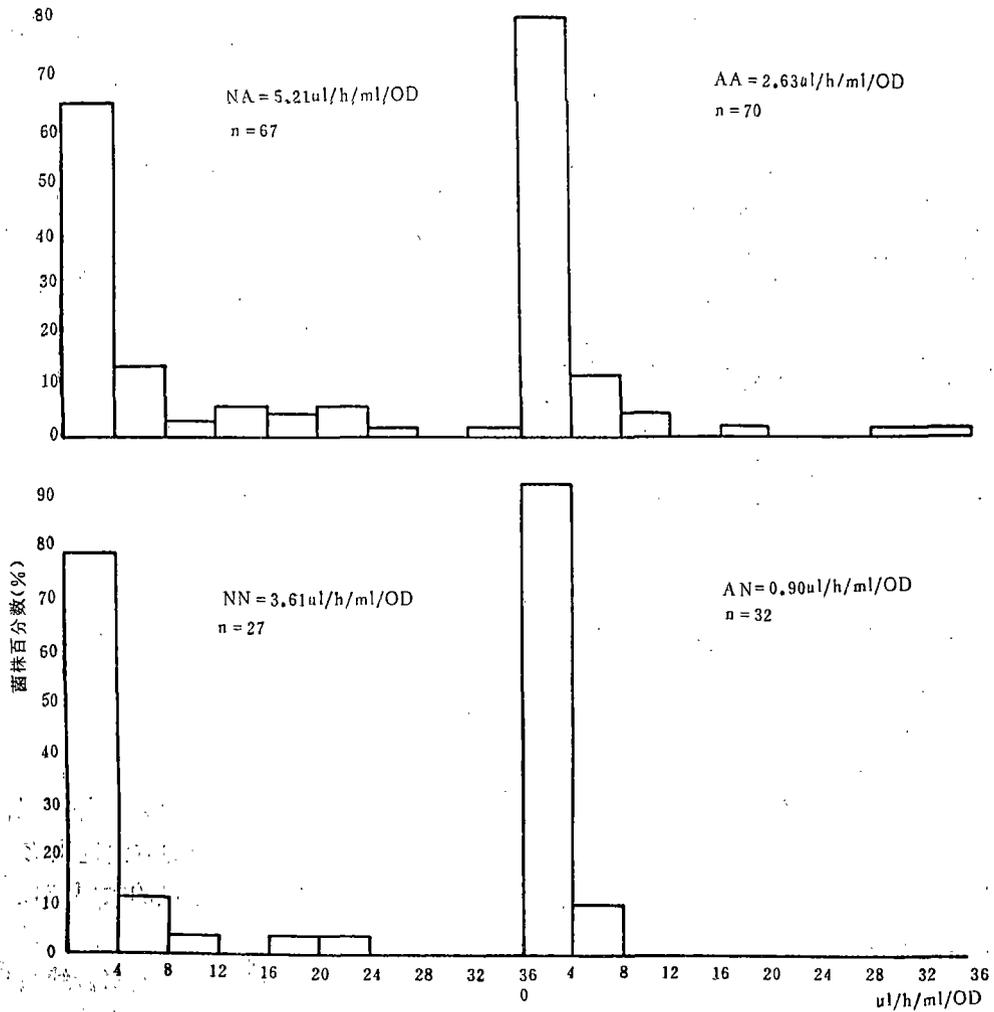


图1 不同氮源对分离光合细菌产氢能力的影响(产氢时间为2天)

NA表示用 N_2 增殖培养,用含 NH_4^+ 培养基进行平板分离; NN表示增殖培养与平板分离全用 N_2 ; AA表示增殖培养与平板分离全用 NH_4^+ ; AN表示用 NH_4^+ 增殖培养,用 N_2 平板分离; n表示菌株数; $\mu\text{l/h/ml/OD}$ 为当培养终了OD折算为1时,每ml培养液每小时产氢的 μl 数。

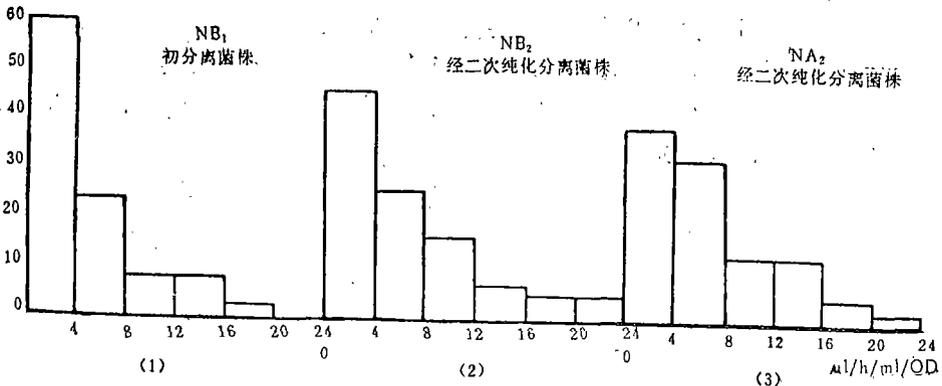


图2 不同碳源对分离细菌产氢能力的影响(产氢时间为4天)

NB₁表示以丁酸为碳源,增殖培养用N₂,平板初分离用NH₄⁺;NB₂表示以丁酸为碳源,增殖培养用N₂,平板第二次分离用NH₄⁺;NA₂表示以苹果酸为碳源,增殖培养用N₂,平板第二次分离用NH₄⁺。

Hillmer和Gest^[4]用*Rps. capsulata*菌从丁酸产氢的收率和速度甚低,但其结果对采用苹果酸或其它碳源分离细菌,再用丁酸产氢,可能找到好菌种得到了启发^[4]。Stevenson等的报告中表明了用9株*Rps. capsulata*菌株用丁酸、乳酸和乙酸的产氢能力,从丁酸转化为H₂的效率为50%,最大产氢速度为790 ml/l/day^[5]。产氢能力主要与有机物电子供体、能量供给和氯化酶活力有关,但对产氢速度而言,起决定作用的因素尚待摸索。

与本试验有关的因素是碳源电子供体,对苹果酸和丁酸两者来说,均有较高的产氢速度,产氢效率也接近。用丁酸分离的菌株(NB 08703)产氢效率为68.7%,平均产氢速度为1130 ml/l/day,最高产氢速度1600 ml/l/day。用苹果酸分离的菌株(NA 08609)产氢效率为68.3%,平均产氢速度为1197 ml/l/day,最高产氢速度1900 ml/l/day。

用丁酸为碳源平板分离容易引起严重污染,而用苹果酸为碳源则无此弊端。

3. 选出光合细菌的鉴定

按“伯杰氏鉴定细菌学手册”鉴定。

NB 08703, NA 08609菌体呈杆状或长椭圆形,没有螺旋状,不弯曲。能同化丙酸盐、甘露糖醇和山梨糖醇,但不能在硫代硫酸盐上生长,系*Rhodospseudomonas*属。

4. 光合细菌的天然产氢能力

除了那些污染的平板外,挑取了所有菌落进行试验,仅从菌落的外观形态不能判断细菌的产氢能力。这与Kim等^[1]的研究结果一致。Kim等人用在N₂中生长的方法选出多种类型的菌落,通过统计处理,发现要确定细菌菌落形态和氯化酶(催化氢生成的主要酶)活性之间关系是很困难的。

(待续)

参 考 文 献

- [1] Kim, J. S., YAMAUCHI, H., Ito, K and TAKAHASHI, H., "Biol. Chem", 46(6), 1469~1474, 1982
- [2] 高桥甫,《发酵工业》, 39, No 5, 394~404, 1981
- [3] 三宅淳,《日本发酵工学会大会要旨》, 269, 1983
- [4] Hillmer, P., Gest, H., "J. Bacteriol", 129, 724, 1977
- [5] Stevens, P., Van Der Sypt, H., De Vos, P., De Ley, J., "Biotechnol Lett", 5, 369, 1983