

非光合 CO₂ 同化微生物菌群的选育/优化及其群落结构分析

胡佳俊¹, 王磊^{2*}, 李艳丽², 付小花², 乐毅全², 徐殿胜¹, 陆兵¹, 于建国³

(1. 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092; 3. 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237)

摘要: 通过从海水及其沉积物中分离、筛选, 并结合电子供体和无机碳源结构的优化以期获得不用光照与供氢的高效固碳微生物菌群; 通过 16S rDNA 序列分析、比对等手段研究非光合固碳微生物菌群的结构, 以期优化群落配置, 进一步提升固碳效率提供理论依据. 结果显示, 通过分离和长期驯化可从海洋中得到在普通好氧、厌氧条件下具有固碳能力的非光合微生物菌群. 添加硫代硫酸钠、硫化钠和氢气作为电子供体可有效提升菌群的固碳效率, 在以硫代硫酸钠为电子供体的好氧、厌氧条件下, 该菌群的 CO₂ 同化效率分别可达 10.44 mg/L 和 12.56 mg/L. 该固碳菌群对混合无机碳源的同化效率显著高于单一碳源, 在以 CO₂、碳酸氢钠及碳酸钠为混合碳源情况下, 菌群好氧、厌氧固碳效率 (以 CO₂ 计) 分别可达 110 mg·(L·d)⁻¹, 和 72 mg·(L·d)⁻¹, 接近氢氧化化细菌的水平. 微生物群落结构分析结果表明, 添加不同电子供体后, 固碳微生物菌群的优势种发生了显著变化, 在发现的 16 个优势菌种中, 11 个是不可培养微生物, 即其只能以共生方式存在. 菌群混合培养时的固碳效率可能是多种菌共同作用的结果, 因此优化固碳微生物菌群的结构和配比将有利于其固碳效率的进一步提升.

关键词: 非光合微生物; CO₂ 同化; 电子供体; 无机碳源结构; 微生物群落结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2438-07

Breeding, Optimization and Community Structure Analysis of Non-photosynthetic CO₂ Assimilation Microbial Flora

HU Jia-jun¹, WANG Lei², LI Yan-li², FU Xiao-hua², LE Yi-quan², XU Dian-sheng¹, LU Bing¹, YU Jian-guo³

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, College of Biochemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 3. College of Resource and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Isolation and screening from sea water and sediments, and the optimization of electron donor and inorganic carbon source structure were performed for obtaining microbial flora with high efficient inorganic carbon fixation without the light and hydrogen. In addition, the structure of the microbial flora was studied through 16S rDNA sequence analysis and contrast for providing theoretical basis to improve carbon fixation efficiency through optimizing microbial flora structure. The result showed that non-photosynthetic microbial flora with the capacity of inorganic carbon fixation under the general aerobic and anaerobic conditions could be obtained from the sea by long-term domestication and isolation. Inorganic carbon fixation efficiency of the microbial flora was enhanced significantly by adding of sodium thiosulfate, sodium sulfide and hydrogen as electron donor. Under the aerobic and anaerobic conditions with sodium thiosulfate as electron donor, the efficiency of inorganic carbon assimilation was 10.44 mg/L and 12.56 mg/L respectively. The assimilation efficiency of the microbial flora with mixed inorganic carbon source was higher than that with single carbon source. When CO₂, sodium bicarbonate and sodium carbonate were added as carbon sources, carbon fixation efficiency of the microbial flora under the aerobic and anaerobic condition was 110 mg·(L·d)⁻¹ and 72 mg·(L·d)⁻¹ respectively which had been closed to the efficiency of hydrogen-oxidizing bacteria. The analysis results showed that the predominant species of the microbial flora varied significantly after the adding of different electron donor. And 11 species of the 16 predominant species in the microbial flora was uncultured. It means that the microbial flora could only exist in symbiotic manner. The inorganic carbon fixation effect of the microbial flora may be the results of co-function of multi-microbial species. Therefore, the optimization of microbial flora structure and proportion is benefit for the further improvement of carbon fixation efficiency.

Key words: non-photosynthetic microbial flora; inorganic carbon assimilation; electron donor; inorganic carbon source structure; microbial flora structure

“温室效应”造成的全球变暖是当前面临的重
大环境问题, CO₂ 作为主要的温室气体, 所造成的温
室效应占总效应的 50%^[1], 且 CO₂ 在大气中存留期

收稿日期: 2008-10-11; 修订日期: 2008-12-16

基金项目: 国家科技支撑计划重大项目(2006BAC01A14); 上海市重大
科技攻关项目(06dz12302)

作者简介: 胡佳俊(1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为二氧化
碳的生物固定, E-mail: hujj0101@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: celwang@yahoo.com

最长可达 200 a.随着人类利用能源速度的不断增长,CO₂ 排放量增长趋势令人担忧.根据政府间气候变化专门委员会(IPCC)预测^[2],人类活动产生的折算 CO₂ 将从 1997 年的 2.71×10^{10} t/a 增长到 2100 年的 9.50×10^{10} t/a,而大气中的 CO₂ 体积分数也将从现在的 3.6×10^{-4} 增长到 2050 年的 7.2×10^{-4} .为减缓温室效应,人们关注的是包括 CO₂ 在内的温室气体的减排^[3,4].然而 CO₂ 又是地球上最丰富的碳源和可再生资源^[5],因此在考虑如何减排 CO₂ 的前提下,研究 CO₂ 的回收与固定,既能有效减少环境中游离的 CO₂,又能将其再生为资源^[6-8],因此已引起了世界各国的广泛关注.CO₂ 的固定方法主要有物理法^[9]、化学法^[10]和生物法^[11],而大多数物理法和化学法能量消耗较大,且物理法固定的 CO₂ 最终都必须结合生物法将其转化为有机碳.生物法固定 CO₂ 主要是依靠植物和微生物^[12],传统上植物的光合作用较为重要也更为人重视,但地球上存在各种各样的环境,尤其是在植物不能生长的特殊环境中,微生物的环境适应性强、生长迅速的优势便显现出来了,因此从整个生物圈的物质流、能量流来看,微生物固定 CO₂ 在环境、能源和资源方面具有极其重要的意义.

目前国际上有关 CO₂ 微生物固定的研究主要集中在藻类^[13]及氢氧化细菌^[14]方面.藻类经济价值较高,但由于需光照培养,在大规模培养时,存在很多难题;且藻类不耐高温和高 CO₂ 浓度,若应用于工业废气(10% ~ 20% CO₂)的直接处理,则效果不佳^[15].在非光合固碳微生物中,氢氧化细菌的生长速率是最快的,而且相比藻类其适应范围更广,但由于培养中需要通 10% 的氢气,在实际应用中存在很多困难,又极不安全^[16-18].因此获得不用供氢与光照的高效固碳微生物是实现 CO₂ 微生物固定与资源化的重要前提.

本研究根据地球起源时期的古细菌具有自养碳同化功能以及海洋中目前尚存在较多古细菌的特点^[19],分别从我国的黄海、东海、南海以及南极海域采集海水和沉积物,通过分离、筛选得到了不用供氢与光照的固碳微生物;并在通过电子供体和无机碳源结构的优化,实现在普通好氧和厌氧条件下的高效固碳;同时运用分子生物学手段分析各培养条件下固碳微生物的群落结构变化,以便为进一步构建高效固碳微生物菌群提供理论依据.研究结果将为发展微生物固碳技术提供技术支撑,并为实现 CO₂

资源化、缓解全球气候变暖提供一种可选择的手段.

1 材料与方法

1.1 非光合固碳微生物的分离与选育

采集我国黄海、东海、南海和南极海域的海水和沉积物(南极样品由上海同济大学南极考察队提供).分别将海水及沉积物稀释液加入到装有培养基的血清瓶中,硅胶塞密封,采用置换排气法配气,再按混合气比例(H₂:O₂:CO₂ = 8.5:0.5:1)用针筒打入相应量的 O₂ 和 CO₂,最后用封口膜封口,置摇床避光振荡培养(28℃,120 r/min),2 ~ 3 d 为一个富集周期,每个周期结束后重新充气,重复富集过程共 2 ~ 3 次得到目的菌液.然后将菌液转接到新的装有培养基的血清瓶中,在好氧(空气:CO₂ = 9:1)及厌氧(N₂:CO₂ = 9:1)2 种气相状况下再次培养 5 ~ 6 个周期.

1.2 实验用品

培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 5.0; KH₂PO₄ 1.0; K₂HPO₄ 2.0; MgSO₄·7H₂O 0.2; NaCl 20; CaCl₂ 0.01; FeSO₄ 0.01;微量元素混合液 2 mL; pH 6.2.

微量元素混合液(mg/L): Na₂MoO₄·2H₂O 1.68; H₃BO₃ 0.4; ZnSO₄·7H₂O 1.0; MnSO₄·5H₂O 1.0; CuSO₄·5H₂O 7.0; CoCl₂·6H₂O 1.0; NiSO₄·7H₂O 1.0.

1.3 置换排气法配气

用乳胶管连接气瓶,并在乳胶管的另一头接上针头,将此针头通过胶塞插入血清瓶中,再将另一针头通过胶塞插入血清瓶中,以便排气.该针头可再接乳胶管、针头及血清瓶,实现多瓶同时充气.气瓶压力调至 0.04 MPa,充气 12 min (用岛津 GC-14B 气相色谱仪测定充气时间为 12 min 即可).

1.4 最佳电子供体与无机碳源结构的选择

在已装有培养基的血清瓶中按 2‰ 的量分别加入可充当电子供体的亚硝酸钠、氯化铵、硫代硫酸钠、硫化钠.在 3 种气相状况下将海水及沉积物中筛选的共 6 种状况的混合菌,以 1 mL 的量加入到已灭菌的装有 40 mL 培养基的 100 mL 血清瓶中,充气、封口,置摇床振荡培养(28℃,120 r/min),2 d 后再次充气,共培养 4 d.用气相色谱仪测定充完气后的血清瓶中气相状况及每培养 24 h 时的气相状况,以了解血清瓶中 CO₂ 变化状况.

选用 CO₂、碳酸钠、碳酸氢钠作为实验中所加无机碳源,利用 Design Expert Software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA, Version 6.0.4)软件设计两水

平部分析因设计(FFD),以考察不同无机碳源结构对微生物碳同化的影响以及各因素之间交互作用,以确定影响微生物碳同化的显著因素.将微生物接种至加入不同无机碳的培养基中,在好氧状况下培养 4 d.

1.5 固碳效率的测定

通过岛津 TOCVCPH 总有机碳分析仪测定菌液的 TOC 值以反映微生物的固碳效率.

1.6 微生物群落结构分析

1.6.1 16S rDNA 的提取及 PCR 扩增

采用 OMIGA 土壤样品总 DNA 小量提取试剂盒,进行细菌基因组 DNA 的提取.16S rDNA 的扩增采用套式 PCR,先用 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'), 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')作为引物.反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min.再以 PCR 产物为模板,用 341f (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGCGGCGGGCGGGGACGGGGGGCCTAGGGGAGGC-AGCAG-3')和 534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')作为引物.反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min.

1.6.2 16S rDNA 序列的测定与分析

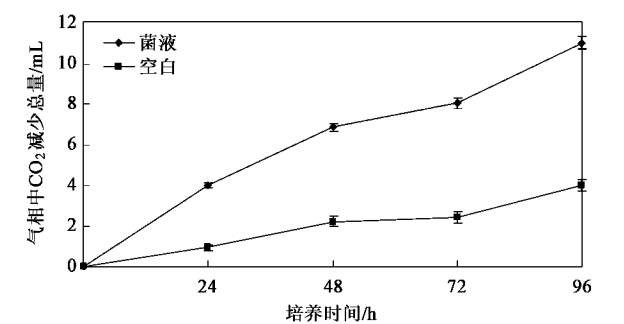
取 16S rDNA V3 区 PCR 产物 50 μL 用乙醇浓缩至 20 μL,采用 Bio-Rad 的 D-Code system 电泳仪进行 DGGE 电泳分离^[20],聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,变性梯度为 30% ~ 60%,以 60℃、80 V,电泳 15 h.电泳完成后用 EB 染色 15 min 后拍照保存.并从凝胶上切下有代表性条带,放入 1.5 mL EP 管中,用 500 μL 无菌水冲洗 2 次,加 50 μL 无菌水并将凝胶弄碎,4℃下过夜,10 000 r/min 离心 5 min,取 1 μL 上清液为模板进行 16S rDNA V3 区 PCR 扩增.产物经过纯化连接到载体 pMD 19-T,转化 *E. coli* Top10 感受态细胞,在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子.采用 T 载体通用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 鉴定,产物片段大小与预期一致的为阳性克隆.再以阳性克隆的 PCR 产物为模板进行 DGGE,与原来的条带在同一位置的克隆即为真正的阳性克隆.交由上海英骏生物公司进行测序.测序结果在 NCBI 核酸序列数据库中序列同源性比较,通过 MEGA 4.0 软件做多重序列比对分析,以邻位相连法构建系统发育树.

2 结果与讨论

2.1 非光合固碳微生物的选育以及菌群生长特性

在固碳微生物的选育与富集过程中,由于培养基中不含其他碳源,微生物唯一可利用的碳源为 CO₂,故通过气相色谱仪测定血清瓶中 CO₂ 的变化情况就可了解到菌群的生长状况,并以此为依据确定之后实验中菌群的培养时间.

图 1 为在充氢气状况下富集 4 d 后从海水中筛选的生长情况最为良好的菌群的生长特性.因 CO₂ 为唯一碳源,故气相中 CO₂ 的绝对减少量的变化趋势也可近似为菌群的生长速率,从图 1 中可知该菌群在 4 d 的培养过程中,菌群基本处于对数生长期,故将之后实验中菌群的培养时间都定为 4 d.在 48 ~ 72 h 时 CO₂ 的减少总量变化趋势有略微下降,这是在 48 h 时血清瓶重新充气所引起的.



其气相条件为 H₂:O₂:CO₂ = 8.5:0.5:1;空白为不经接种培养基

图 1 血清瓶中 CO₂ 变化情况

Fig.1 Chang of CO₂ volume in the serum bottle

将上述初筛得的微生物菌群在好氧、厌氧及充氢条件下进行二次驯化与培育,发现一段时间后其同化 CO₂ 能力有所增强,结果如表 1 所示.

表 1 各状况下微生物培养 4 d 固碳量(以 CO₂ 计)/mg·L⁻¹

Table 1 Volume of microbial carbon fixation after cultured 4 d under all conditions (in terms of CO ₂)/mg·L ⁻¹			
驯化时间	好氧	厌氧	充氢
初筛菌群	5.17	1.77	50.64
驯化 2 个月	5.69	1.81	56.79
驯化 4 个月	6.30	2.05	63.47
驯化 6 个月	7.47	2.42	74.01

这些结果表明通过特定条件下的富集和培育,从海水中可选育得到具有较高固碳能力的非光合微生物,但供氢条件下的固碳效率仍显著高于普通好氧和厌氧条件下的.为进一步提高在普通好氧、厌氧条件下的固碳效率,有必要进一步优化其固碳工艺条件.

2.2 不同电子供体和无机碳源结构对微生物菌群固碳效率的影响

与有机碳源不同,CO₂ 只能向非光合微生物提供合成细胞成分所需碳源,却无法提供相应能量,这部分能量微生物只能从无机化合物的氧化过程中获得.在培养基中以 2‰ 的量分别加入数种可充当电子供体的物质,再分别接入从海水、沉积物中所筛得的微生物(以下简称海水样与沉积物样),培养 4 d 后,用总有机碳分析仪测定菌液的 TOC 值,结果如图 2 和图 3 所示.

比较图 2 和图 3 可知,在各种电子供体情况下,来源于海水的菌群生长情况都优于来源于沉积物的,即海水菌群固碳能力较强.这可能是由于海水营养较贫瘠,因而具有固碳功能的自养微生物相对较多.在普通好氧状况下,硫代硫酸钠的加入可明显提高菌液的 TOC 值,其固碳效率已达到供氢条件的 50% 左右,说明其能有效促进无机条件下固碳微生物的生长;而硫化钠只对海水菌群有效;亚硝酸钠的加入对海水菌群产生了某种生长抑制作用;氯化铵则基本无效.在厌氧状况下,除硫化钠对沉积物样无效外,其他情况下各电子供体都显示出良好的生长促进作用(在充氢气状况下,氯化铵、硫化钠对海水样、沉积物样都有促进作用;亚硝酸钠对二者都产生了抑制作用;硫代硫酸钠对沉积物样有明显效果,对海水样却基本无效).

表 2 为各电子供体氧化时所产生能量^[21],再结合图 2 和图 3 的结果可知,除去氯化铵及氢气,各电子供体对微生物生长促进效果的优劣基本与其氧化时所产生的能量多少有关.而氯化铵之所以没有起到预期效果,可能与培养基中原本就存在 NH₄⁺ 有关.氢气对微生物固碳效率的促进作用可能与菌种的特性及其固碳途径有关.亚硝酸钠在有氧状况下对固碳微生物无促进作用可能是由于好氧情况下亚硝酸钠极易被氧化为硝酸盐,从而无法还原 CO₂.

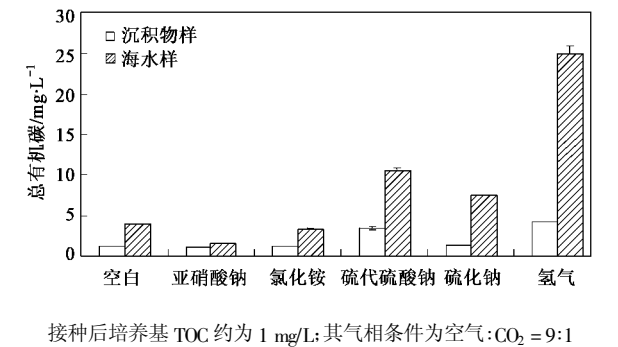


图 2 好氧状况下培养 4 d 菌群 TOC 值

Fig.2 TOC value of microbial flora after cultured 4 d under aerobic condition

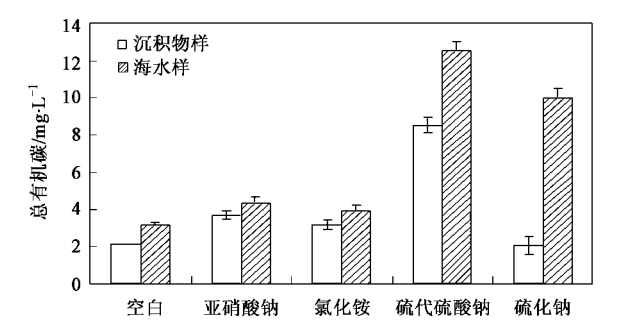


图 3 厌氧状况下培养 4 d 菌群 TOC 值

Fig.3 TOC value of microbial flora after cultured 4 d under anaerobic condition

表 2 各电子供体氧化时所产生能量	
Table 2 Each electron donor oxidation produce energy	
电子供体	能量 × 4.184/kJ·mol ⁻¹
亚硝酸钠	18.1
硫化钠	50.1
氯化铵	65.1
硫代硫酸钠	100
氢气	56.7

通过加入不同无机碳作为碳源,丰富微生物培养时的碳源结构,以期达到提高菌液的无机碳同化效率的目的.结果如图 4 所示,混合无机碳源情况下微生物的固碳效率显著高于单一的无机碳源,3 种无机碳混合情况下,好氧条件下培养 4 d,菌液 TOC 浓度平均从 1.47 mg/L 达到了 119.65 mg/L,即其固碳效率(以 CO₂ 计)可达 110 mg·(L·d)⁻¹.在该无机碳源结构下,接种在厌氧条件下驯化的菌群,其固碳效率(以 CO₂ 计)可达 72 mg·(L·d)⁻¹.这是一个非常有意义的结果,对于混合无机碳源对微生物固碳效率

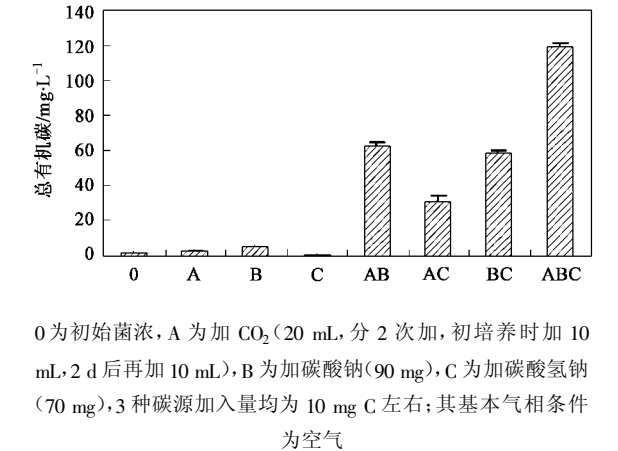


图 4 加不同无机碳培养 4 d 菌群 TOC 值

Fig.4 TOC value of microbial flora after cultured 4 d by different inorganic carbon sources

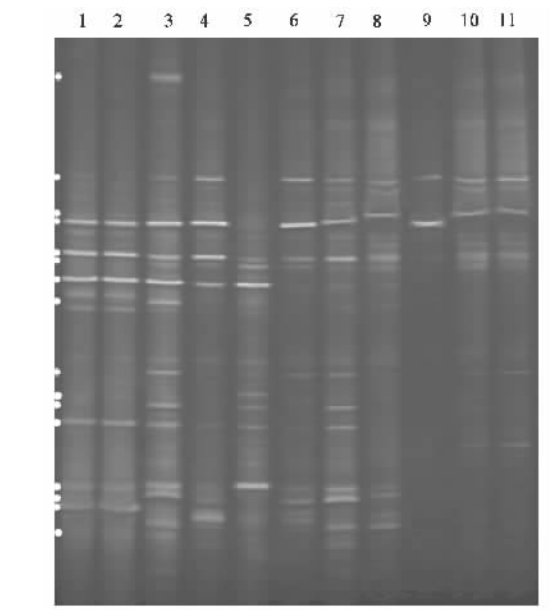
的促进机制尚在研究之中。

上述结果表明,通过培养基中电子供体以及无机碳源结构的优化可显著提高非光合微生物的固碳效率,在普通好氧和厌氧条件下其固碳效率已接近供氢条件下的微生物固碳效率.当然目前得到的培养条件可能尚不是该固碳微生物菌群的最佳固碳条件,通过进一步的工艺优化,其固碳效率可能会得到进一步的提升.

2.3 不同培养条件下的固碳微生物群落结构

为阐明不同培养条件下固碳微生物的群落结构,以期优化微生物群落结构配置,进一步提升固碳效率提供理论依据,通过 PCR-DGGE 技术研究了不同电子供体、不同气相条件下固碳微生物群落结构变化,结果如图 5 所示.从中可见,各电子供体及不同气相状况确实引起了菌群的群落结构发生改变.初始水样、沉积物样菌群群落结构极其相似,但是通过不同条件的培养后,菌群中的微生物多样性有所下降(特别是以非 H_2 为电子供体的情况下,泳道 5~11),而且其种群结构也发生显著变化,这表明虽然原始的水样和沉积物样中优势菌群基本一致,但所含的其他弱势菌群却极其不同,故在随后的不同培养条件下水样和沉积物样菌群的群落结构及优势菌发生显著变化,且海洋中能够利用 H_2 作为电子供体还原 CO_2 的微生物种类显著多于能利用其他无机物作为电子供体的微生物.一些条带如序列 3-10(从上往下第 3 个白点所在行,第 10 泳道所在列)不论在好氧、厌氧情况下都有存在,说明该序列菌株因是兼性好氧的;而另一些条带如序列 1-3 则是初始菌群中没有的条带,说明在原菌群中该菌为劣势菌,所占百分比相当低,而在改变培养条件后,在适合其生长的条件下变为了优势菌.泳道 10 与 11,虽然同是沉积物样,但从先前的图 3 中通过比较厌氧状况下菌群培养 4 d 后 TOC 值可知,在加入不同电子供体后,它们生长情况都比对照良好,且相互间增加幅度有所差异,但从图 5 所见,两者优势菌又基本一致,这可能表明这些优势菌可用不同途径利用这些不同的电子供体以供微生物还原 CO_2 .

割取有代表性条带,经扩增、克隆转化后,送生物公司测序,并将结果上传至 GenBank 数据库中用 BLAST 进行检索和同源性比较,结果如表 3 所示.其中有 11 个条带代表的是不可培养的共生菌株,而在 NCBI 中查询这些菌株的分离源可知其基本全为在海洋或海洋沉积物中分离所得,是海洋中所独有的.这表明这些微生物只能以共生方式存在,混合培养



左侧白点为所割条带纵坐标,从上至下为 1~16;横坐标中,1. 初始海水样菌群,2. 初始沉积物样菌群,3. 充氢海水样菌群加 Na_2S ,4. 充氢沉积物样菌群加 Na_2S ,5. 好氧海水样菌群加 Na_2S ,6. 好氧海水样菌群加 $Na_2S_2O_3$,7. 好氧沉积物样菌群加 Na_2S ,8. 厌氧海水样菌群加 $Na_2S_2O_3$,9. 厌氧海水样菌群加 Na_2S ,10. 厌氧沉积物样菌群加 $Na_2S_2O_3$,11. 厌氧沉积物样菌群加 $NaNO_2$

图 5 DGGE 分析结果

Fig. 5 DGGE analysis

时,同化 CO_2 的效果可能是多种菌的叠加.这意味着单一纯种微生物的固碳效率可能较低,进一步研究与优化固碳微生物菌群的结构和配比将有利于固碳效率的提升.

将所得序列用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树,结果如图 6 所示.在同一发育分支中的 Uncultured *Thioclava* sp. (EU167470) 与 Uncultured bacterium (AB244004),均在泳道 5 出现.它们在初始菌株中不存在或不明显,而在好氧条件下加入 Na_2S

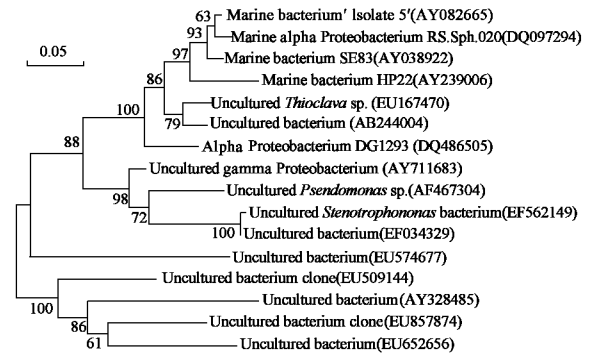


图 6 优势菌的系统发育树

Fig. 6 Unrooted phylogenetic tree based on 16S rDNA-V3 sequences representing the respective DGGE bands in Table 3

表 3 DGGE 条带的序列比对结果

Table 3 16S rDNA V3 sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in DGGE gels			
割胶条带	序列长度/bp	GenBank 数据库中最相似菌株名称(序列号)	相似度/%
1-3	189	Uncultured bacterium clone(EU509144)	96
2-4	169	Marine bacterium 'Isolate 5'(AY082665)	98
3-10	169	Uncultured bacterium(EU574677)	98
4-1	169	Marine bacterium HP22(AY239006)	99
5-2	189	Uncultured bacterium(AY328485)	97
6-5	190	Uncultured bacterium clone(EU857874)	90
7-5	194	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.(AF467304)	100
8-3	189	Uncultured bacterium(EU652656)	96
9-3	169	Alpha Proteobacterium DG1293(DQ486505)	99
10-5	169	Uncultured <i>Thioclava</i> sp.(EU167470)	98
11-3	169	Uncultured gamma Proteobacterium(AY711683)	99
12-1	194	Uncultured <i>Stenotrophomonas</i> bacterium(EF562149)	98
13-5	169	Uncultured bacterium (AB244004)	98
14-7	169	Marine alpha Proteobacterium RS.Sph.020(DQ097294)	99
15-2	194	Uncultured bacterium(EF034329)	97
16-7	169	Marine bacterium SE83(AY038922)	99

后出现,说明它们可有效利用 Na₂S 作为电子供体进而使自身成为优势菌,这正好与 *Thioclava* 类菌株可利用 S²⁻ 的特性相符。

3 结论

(1)从海洋中可选育得到在普通好氧、厌氧状况下均可有效固碳的非光合微生物菌群,且来源于海水的微生物的固碳能力显著高于来源于沉积物中的。

(2)加入不同电子供体可有效提高非光合微生物的固碳效率,其中尤以硫化钠、硫代硫酸钠最为有效,而几种无机碳源的混合可大幅度提高固碳菌群的固碳效率,在普通好氧和厌氧条件下的固碳效率(以 CO₂ 计)分别可达 110 mg•(L•d)⁻¹ 和 72 mg•(L•d)⁻¹,已接近供氢条件下的固碳效率。

(3)不同电子供体条件下的固碳微生物群落结构有显著差异,在供氢条件下的微生物多样性显著高于其他电子供体条件下的,这表明海洋中能够利用 H₂ 作为电子供体还原 CO₂ 的微生物种类显著多于能利用其他无机物作为电子供体的微生物。

(4)固碳菌群中的优势菌主要为来源于海洋的不可培养微生物,因此混合培养时,CO₂ 的同化可能是多种菌共同作用的结果。

参考文献:

[1] Yang H Q, Xu Z H, Fan M H, *et al.* Progress in carbon dioxide separation and capture: A review [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, **20**: 14-27.

[2] Thomas. Carbon dioxide capture for storage in deep geologic

formations-results from the CO₂ capture project [M]. UK: Elsevier Science Ltd, 2005. 1-15.

[3] 宋长春, 杨文燕, 徐小锋, 等. 沼泽湿地生态系统土壤 CO₂ 和 CH₄ 排放动态及影响因素[J]. 环境科学, 2004, **25**(4): 1-6.

[4] 赵小杰, 郑华, 赵同谦, 等. 水库温室气体排放及影响因素 [J]. 环境科学, 2008, **29**(8): 2377-2384.

[5] Zhang X H, Li L Q, Pan G X. Topsoil organic carbon mineralization and CO₂ evolution of three paddy soils from South China and the temperature dependence [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**: 319-326.

[6] Oexmann J, Hensel C, Kather A. Post-combustion CO₂-capture from coal-fired power plants: Preliminary evaluation of an integrated chemical absorption process with piperazine-promoted potassium carbonate [J]. International Journal of Greenhouse Gas Control, 2008, **2**: 539-552.

[7] Okabe K, Mano H, Fujioka Y. Separation and recovery of carbon dioxide by a membrane flash process [J]. International Journal of Greenhouse Gas Control, 2008, **2**: 485-491.

[8] Rodriguez N, Alonso M, Grasa G, *et al.* Process for capturing CO₂ arising from the calcination CaCO₃ used in cement manufacture [J]. Environmental Science Technology, 2008, **42**: 6980-6984.

[9] Alvaro M, Baleizao C, Das D, *et al.* CO₂ fixation using recoverable chromium salen catalysts: use of ionic liquids as cosolvent or high-surface-area silicates as supports [J]. Journal of Catalysis, 2004, **228**: 254-258.

[10] Li F W, Xiao L F, Xia C G, *et al.* Chemical fixation of CO₂ with highly efficient ZnCl₂/[BMIm]Br catalyst system [J]. Tetrahedron Letters, 2004, **45**: 8307-8310.

[11] Hsueh H T, Chu H, Yu S T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae [J]. Chemosphere, 2007, **66**: 878-886.

- [12] Miltner A, Kopinke F D, Kindler R, *et al.* Non-phototrophic CO₂ fixation by soil microorganisms [J]. *Plant and Soil*, 2005, **269**: 193-203.
- [13] Aresta M, Dibenedetto A, Barberio G, *et al.* Utilization of macroalgae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study [J]. *Fuel Processing Technology*, 2005, **86**: 1679-1693.
- [14] Bae S, Kwak K, Kim S, *et al.* Isolation and characterization of CO₂-fixing hydrogen-oxidizing marine bacteria [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **91**(5): 442-448.
- [15] 程丽华, 张林, 陈欢林, 等. 微藻固定 CO₂ 研究进展[J]. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 177-181.
- [16] 徐岩, 儿玉澈. 氢氧化细菌胞内糖原的生成和作用[J]. *无锡轻工业大学学报*, 1997, **16**(4): 19-23.
- [17] 王竞, 周集体, 张晶晶, 等. 固定 CO₂ 氢细菌的筛选及其培养条件优化[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, **6**(3): 271-275.
- [18] Kwak K O, Jung S J, Chung S Y, *et al.* Optimization of culture conditions for CO₂ fixation by a chemoautotrophic microorganism, strain YN-1 using factorial design [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, **31**: 1-7.
- [19] Scott K M, Cavanaugh C M. CO₂ uptake and fixation by endosymbiotic chemoautotrophs from the bivalve *solemya velum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(4): 1174-1179.
- [20] 刘敏, 朱开玲, 李洪波, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. *环境科学*, 2008, **29**(4): 1082-1091.
- [21] 郑士民, 颜望明, 钱新民. 自养微生物 [M]. 北京: 科学出版社, 1983. 118.