

## 中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BYS-1 的渗透调节\*

洪青 张国顺 张忠辉 何健 李顺鹏\*\*

(南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

**摘要:** *Halomonas* sp. BYS-1 是一株从活性污泥中分离的中度嗜盐菌, 它能在 0.1~2.6 mol/L NaCl 的以苯乙酸为唯一碳源的基础培养基中生长。BYS-1 在不同 NaCl 条件下生长时, 胞内的 Na<sup>+</sup> 含量基本不发生变化; 它主要通过积累 K<sup>+</sup>、谷氨酸和甜菜碱来调节胞内外的渗透压平衡。当培养基中的 NaCl 浓度从 0.1 mol/L 上升到 2.0 mol/L 时, 其胞内的 K<sup>+</sup>、谷氨酸和甜菜碱分别提高了 1.9、2.4 和 13.6 倍。

**关键词:** 中度嗜盐菌, 渗透调节, K<sup>+</sup>, 谷氨酸, 甜菜碱

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0071-05

### Osmoregulation of a Halophilic Bacteria Strain *Halomonas* sp. BYS-1

HONG Qing ZHANG Guo-Shun ZHANG Zhong-Hui HE Jian LI Shun-Peng\*\*

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** *Halomonas* sp. BYS-1 was a moderately halophilic bacteria strain isolated from activated sludge. It could grow on MM with NaCl concentration from 0.1~2.6 mol/L and phenyl acetic acid as sole carbon source. When BYS-1 grew in the media with different concentrations of NaCl, there was no obvious change in its intracellular Na<sup>+</sup> contents, it accumulated K<sup>+</sup>, glutamic acid and betaine as osmoprotectants. Its intracellular contents of K<sup>+</sup>, glutamic acid and betaine increased by 1.9, 2.4 and 13.6 times, respectively, when the concentration of NaCl increased from 0.1 mol/L to 2mol/L.

**Key words:** Moderately halophilic bacteria, Osmoregulation, K<sup>+</sup>, Glutamic acid, Betaine

嗜盐菌是存在于高盐环境中的一类极端微生物, 嗜盐菌包括中度嗜盐菌和极端嗜盐(古)菌, 早期对嗜盐菌的研究主要集中于嗜盐古菌(Halobacteriaceae), 因为它们具有一些独特的特征, 如: 高度盐化的原生质; 对盐有着特殊要求的蛋白质; 独特的电光能驱动的质子和氯离子泵; 细菌视紫红质等<sup>[1]</sup>。目前对中度嗜盐菌的研究也开始热起来, 因为它们能在水活度为 0.98 (接近淡水的活度) 和 0.86 (接近与饱和 NaCl 的浓度) 之间生存, 嗜盐古菌是不能在这么宽的盐浓度范围内生存的, 而且中度嗜盐菌属于真细菌, 可以利用以细菌为基础发展起来的分子生物学方法和手段, 通过对它们的研究来解答有关渗透调节等方面的问题也许会容易一些<sup>[2]</sup>。本实验对从处理苯乙酸废水的高盐污泥中分离的一株中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BYS-1 的渗透调节机理进行了一些研究。

\* 国家“863 计划”(No. 2001 AA214121)

南京农业大学青年科技创新基金 (No. KJ04018)

\*\* 联系人 Fax (Tel): 025-84396314, E-mail: isp@njau.edu.cn

收稿日期: 2003-12-18, 修回日期: 2004-02-25

# 1 材料与方法

## 1.1 实验菌株

*Halomonas* sp. BYS-1 为本实验室分离保存，它能降解苯乙酸和其它多种芳香族化合物。

## 1.2 培养基

Gibbons 培养基：酪素水解物 5 g，酵母浸出物 10 g，胰蛋白胨 5 g，柠檬酸三钠 3 g，KCl 2 g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g，NaCl 的量视具体情况添加，定容至 1 L，pH 7.2。苯乙酸基础培养基（由 M63<sup>[3]</sup> 作适当调整）： $KH_2PO_4$  13.6 g，KOH 4.2 g， $(NH_4)_2SO_4$  2 g， $FeSO_4$  微量， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g，苯乙酸 1 g，NaCl 的量视需要添加，定容至 1L，pH 7.2。

## 1.3 方法

细胞的可溶性有机物的提取参照文献[4]；胞内游离氨基酸的测定：茚三酮比色法；全氨基酸分析：日立 835-50 型氨基酸自动分析仪；甜菜碱的测定参照文献[5]；胞内  $K^+$ ， $Na^+$  的提取和测定参考文献[6]；菌体蛋白的测定采用双缩脲法。

# 2 结果与讨论

## 2.1 BYS-1 在不同培养基中的耐盐情况

由图 1 可以看出，BYS-1 能在 NaCl 浓度为 0~3.4 mol/L 的 Gibbons 培养基 (GM) 中生长，具有很强耐盐和适应盐浓度变化的能力，其最适生长 NaCl 浓度为 1.0 mol/L，在 0.6~1.0 mol/L 这个范围内，NaCl 浓度的变化对其生长量的影响不大，当盐浓度高于 1.8 mol/L 后，其生长量下降得特别快。BYS-1 在苯乙酸培养基 (BM) 中的生长量变化趋势和它在 Gibbons 培养基中的变化趋势相似，其最适生长 NaCl 浓度仍然是 1.0 mol/L，但是在相同 NaCl 浓度条件下，它在 Gibbons 培养基中的生长量要高于在苯乙酸基础培养基中的生长量，而且它能耐受的 NaCl 浓度范围要比在 Gibbons 培养基中窄，它不能在 NaCl 浓度低于 0.1 mol/L 或高于 2.6 mol/L 的条件下生长，这种现象其他学者在研究中嗜盐菌时也发现过<sup>[7]</sup>，他们认为这可能是由于 Gibbons 培养基的成分复杂，营养丰富，含有多种生长因子，菌体可以直接从培养基中吸收而不需要从头合成而消耗能量。另外一种可能是该培养基中含有可用来调节渗透压的相容性物质，菌体吸收了这些物质

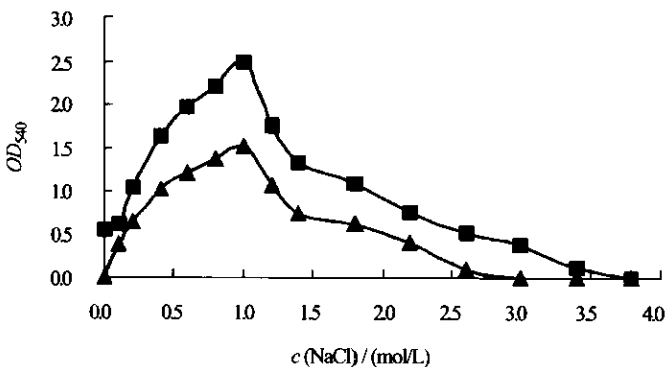


图 1 BYS-1 在不同 NaCl 浓度的 GM 和 BM 中的生长情况

■ - GM, ▲ - BM

后可以克服高盐对其生长的抑制。

## 2.2 BYS-1 在不同盐浓度下生长时胞内 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 浓度的变化

由图2中可以看出,当BYS-1在不同的NaCl浓度下生长时,其胞内 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 含量的变化趋势是不同的,对于 $\text{Na}^+$ 而言,在0.1 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L NaCl培养基中生长的细胞内 $\text{Na}^+$ 含量分别为9.8、11.5、11.5  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ,说明菌体内 $\text{Na}^+$ 含量基本不随外界盐浓度的变化而变化,而是维持在一个相对较低的水平。不过,对于 $\text{K}^+$ 而言,在0.1 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L NaCl培养基中生长的细胞内 $\text{K}^+$ 含量分别为12.8、33.6、37.2  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ,这表明当菌株在低于最适生长NaCl浓度条件下生长时,它会通过积累一些 $\text{K}^+$ 来维持细胞的渗透压,但是当NaCl浓度高于1.0 mol/L时, $\text{K}^+$ 在这方面所起的作用就不很明显了。

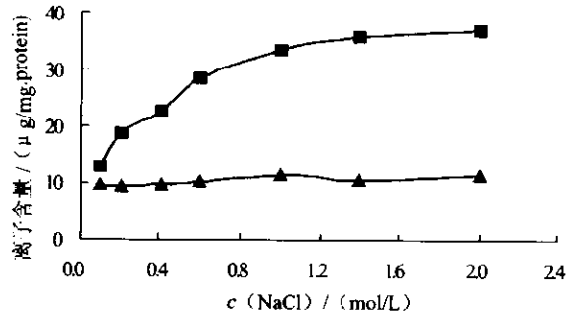


图2 不同NaCl浓度对BYS-1胞内 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 含量的影响

■  $\text{K}^+$ , ▲  $\text{Na}^+$

## 2.3 BYS-1 在不同盐浓度下生长时胞内游离氨基酸的变化

由图3中可以看出,随着培养基中NaCl浓度的升高,BYS-1胞内的总游离氨基酸含量也呈增加的趋势,但是当NaCl浓度高于1 mol/L后,游离氨基酸的增加幅度有所下降,为了考察究竟是那几种氨基酸得到了增加,我们利用氨基酸自动分析仪对不同NaCl浓度下胞内的总游离氨基酸库进行了分析(表1)。

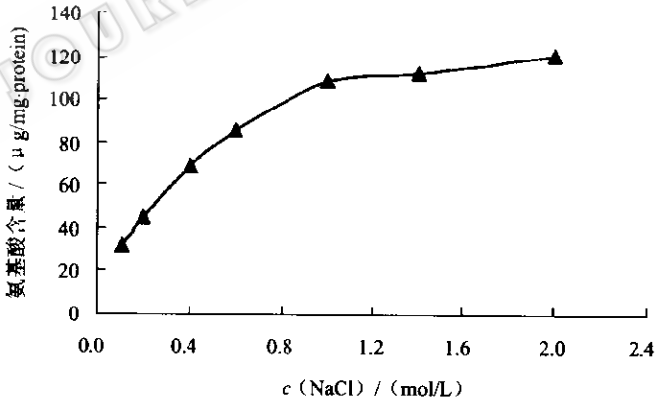


图3 不同NaCl浓度对BYS-1胞内游离氨基酸含量的影响

表1 不同NaCl浓度对BYS-1胞内游离氨基酸库组成的影响 (ND = no detection)

氨基酸	氨基酸浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ )		
	0.1 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	2.0 mol/L NaCl
胱氨酸	1.65	1.87	1.76
天门冬氨酸	4.38	18.65	20.85

续表1

苏氨酸	0.58	0.68	0.71
丝氨酸	1.08	2.16	2.35
谷氨酸	12.84	72.27	80.56
脯氨酸	0.58	0.57	0.89
甘氨酸	0.93	0.98	1.03
丙氨酸	4.18	5.26	4.86
缬氨酸	0.86	0.83	0.91
蛋氨酸	0.95	1.10	1.27
亮氨酸	0.26	0.29	0.26
酪氨酸	ND	0.28	0.34
苯丙氨酸	0.64	0.67	0.72
组氨酸	0.44	0.60	0.54
赖氨酸	0.98	1.05	1.14
精氨酸	1.20	1.39	1.29
游离氨基酸总量	31.55	108.56	119.48
谷氨酸%	40.69	66.58	67.43
谷氨酸 + 天门冬氨酸%	54.58	81.41	84.82

由表1中可以看出,在BYS-1胞内总游离氨基酸库中,谷氨酸占很大比例,无论是在低盐、最适生长盐浓度、还是高盐条件下都达到了总氨基酸的一半左右,天门冬氨酸的含量虽然比谷氨酸低得多,不过和其它氨基酸相比,它还是比较高的。当培养基盐浓度从0.1 mol/L升高到1.0 mol/L和2.0 mol/L时,其胞内总游离氨基酸从31.55  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$  分别增加到108.56和119.48  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ,而谷氨酸从12.84  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$  分别增加到72.27和80.56  $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ,说明游离氨基酸库的增加主要来自谷氨酸的增加。谷氨酸在总游离氨基酸库中所占的比例也由所上升,不过从增加幅度来看,无论是总游离氨基酸库,还是谷氨酸,它们从0.1 mol/L到1.0 mol/L的增加幅度,要大大高于从1.0 mol/L到2.0 mol/L的增加幅度。据相关的文献报道<sup>[8]</sup>,在*H. elongata*中,细胞内总游离氨基酸库随着外界盐度的增加而增加,当菌株生长在NaCl浓度为0.05 mol/L, 1.37 mol/L和3.4 mol/L时,它胞内游离氨基酸的浓度分别是16 mmol/L, 105 mmol/L和358 mmol/L,其中Glu的浓度是最高的,其次是Ala和Gln。在BYS-1中,随着外界NaCl浓度的升高, $\text{K}^+$ 、谷氨酸和天门冬氨酸的浓度都有所升高,而且它们变化趋势基本是一致的,即在低于最适生长盐浓度条件下,它们的增加趋势和盐浓度的增加有一定的正相关性,在高盐浓度时,它们的增加就不明显了。其内在联系可以从以下几个方面去分析:(1)  $\text{K}^+$ 由于水合程度低,对生物大分子的作用也较弱,积累一定量的 $\text{K}^+$ 能提高细胞内的渗透压,而又不至于对细胞活性有太大的影响。而 $\text{Na}^+$ 就不行,如Measures<sup>[9]</sup>的体外实验就证明, $\text{Na}^+$ 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、葡萄金黄球菌的醛醇酶、异柠檬酸脱氢酶、磷酸己糖异构酶的活性有严重的抑制作用。(2)  $\text{K}^+$ 带正电荷,而谷氨酸和天门冬氨酸带负电荷,它们增加的趋势又相似,刚好可以互相中和电荷,使细胞维持电荷中性。这样它们可以起到渗透调节的作用。但是当外界的盐浓度高于最适生长盐浓度时,它们的增加趋势就不明显了,细胞就需要其它的相容性物质来对抗外界的渗透压。为此我们研究了BYS-1积累甜菜碱的情况。

#### 2.4 BYS-1在不同盐浓度下胞内甜菜碱的积累情况

由图4中可以看出,当BYS-1在0.1 mol/L NaCl苯乙酸基础培养基中生长时,它胞

内的甜菜碱含量为  $13.5 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ，随着培养基中  $\text{NaCl}$  浓度的增加，胞内甜菜碱含量也在增加，当培养基中的  $\text{NaCl}$  浓度为  $1.0 \text{ mol/L}$  时，甜菜碱的含量上升到  $89.4 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ，增加了约 5.7 倍，当  $\text{NaCl}$  浓度为  $2.0 \text{ mol/L}$  时，它的含量上升到  $198.8 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ ，增加的幅度还有所上升，这一变化趋势和  $\text{K}^+$ 、谷氨酸一样，这表明甜菜碱在 BYS-1 的耐盐渗透调节中起着尤其重要的作用，特别是在高盐条件下，它的作用更加明显。从甜菜碱的结构和性质上来看，它为氨基酸衍生物，其 N 上的 H 被三个甲基所取代，N 带正电荷和  $-\text{COO}^-$  形成内盐，所以本身不带净电荷，且在水中的溶解性好，在细胞内高浓度积累对生物大分子的结构和功能影响较小。所以在外界盐浓度相当高的时候，大量积累甜菜碱要比积累氨基酸和  $\text{K}^+$  效率更高。一些嗜盐菌，如大肠杆菌在外界盐浓度升高时，往往利用游离氨基酸和  $\text{K}^+$  作为调渗物质，由于游离氨基酸和  $\text{K}^+$  带有电荷，过多积累会影响到生物大分子的结构和功能，所以以氨基酸和  $\text{K}^+$  为主要调渗物质的细菌往往耐盐能力不高；而一些耐盐和适应盐变化能力强的微生物往往利用甜菜碱和其它三甲基内氨 (QAC) 作为渗透保护剂。

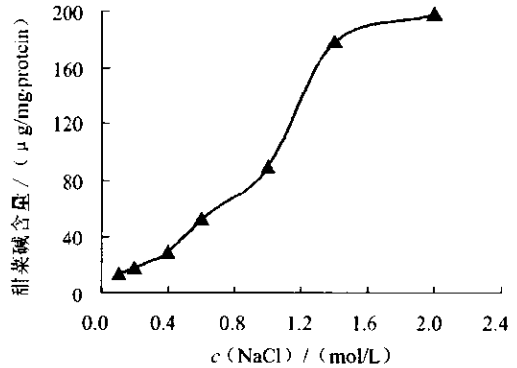


图4 不同  $\text{NaCl}$  浓度对 BYS-1 胞内甜菜碱量的影响

### 3 结论

(1) 中度嗜盐菌 BYS-1 在不同的培养基中的生长特性和耐盐范围不一样，在 Gibbons 培养基中，它能在  $0 \sim 3.4 \text{ mol/L}$   $\text{NaCl}$  的范围内生长，在苯乙酸基础培养基中，它只能在  $0.1 \sim 2.6 \text{ mol/L}$   $\text{NaCl}$  的范围内生长，但是它在两种培养基中的最适生长  $\text{NaCl}$  浓度都是  $1.0 \text{ mol/L}$ 。

(2) BYS-1 在不同  $\text{NaCl}$  条件下生长时，胞内的  $\text{Na}^+$  含量基本不发生变化；它主要通过积累  $\text{K}^+$ 、谷氨酸和甜菜碱来调节胞内外的渗透压平衡。

(3) BYS-1 胞内的  $\text{K}^+$ 、谷氨酸和甜菜碱的变化和外界  $\text{NaCl}$  浓度的变化呈正相关，当培养基中的  $\text{NaCl}$  浓度从  $0.1 \text{ mol/L}$  上升到  $2.0 \text{ mol/L}$  时，BYS-1 胞内的  $\text{K}^+$ 、谷氨酸和甜菜碱分别提高了 1.9、2.4 和 13.6 倍。

### 参考文献

- [1] Antonio V, Joaquin J N, Aharon O. Microbiological and Molecular Biology Reviews, 1998, 504 - 544.
- [2] Ramos-Cormenzana. Ecology of moderately halophilic bacteria. In: Vreeland R H, Hochstein L H. The biology of halophilic bacteria. CRC Press, 1993. 55 - 86.
- [3] Larsen P L, Sydne L K, Landfald, et al. Arch Microbiol, 1987, 147: 1 - 7.
- [4] Tempest D W, Meers J L. General Microbial, 1970, 60: 213 - 217.
- [5] Grieve C M, Grattan S R. Plant and Soil, 1983, 70: 303 - 307.
- [6] 国家环保总局等编. 水和废水监测分析方法 (第三版). 北京: 中国环境科学出版社, 1997.
- [7] Elisa M, Gilmour D. Journal Microbiology, 1987, 19: 363 - 365.
- [8] Vreeland R H, Mierau B D, Litchfield C D. Can J Microbiol, 1983, 29: 407 - 414.
- [9] Measure J C. Nature, 1975, 257: 398 - 400.