

耐盐降解性菌株 A1(*Arthrobacter* sp. A1) 的渗透调节*

何 健 洪 青 李顺鹏[†] 崔中利 顾向阳 刘 智

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点实验室, 南京 210095)

摘 要 菌株 A1(*Arthrobacter* sp. A1) 分离自降解含盐(NaCl 浓度为 0.77 mol L^{-1}) 苯乙酸生产污水的活性污泥。该菌株能在 NaCl 浓度为 0.1 mol L^{-1} ~ 2.0 mol L^{-1} 以苯乙酸为惟一碳源的基础培养基中生长。在不同的 NaCl 浓度下, 菌株 A1 细胞内的 QAC(Quaternary ammonium compounds)、游离谷氨酸和 K^+ 含量与盐浓度的升高成正相关。在盐激条件下, 菌株 A1 细胞内的 QAC、游离谷氨酸和 K^+ 含量急剧增加, 当外界的盐浓度突然从 0.1 mol L^{-1} 增加到 1.0 mol L^{-1} 时, 其细胞内的 QAC 和游离谷氨酸含量在 40 分钟内分别增加了 4.9 倍和 2.1 倍。

关键词 渗透调节, QAC, 游离谷氨酸, K^+

中图分类号 X172

含盐污水不但来源于海水利用, 还广泛来源于工业生产。如油田采油污水的含盐量为 5% 左右, 苯乙酸生产污水(原污水)的含盐量在 20% 左右。氯丁橡胶污水的含盐量为 1.8%~2.8%。这些工业污水不但无机盐份含量高, 而且往往含有高浓度的难于生化降解或有毒的有机物如芳族化合物和卤代化合物等。目前对含盐工业污水生化处理的研究仅仅停留在实验室配水实验, 且得出的结论不很一致。其中一个主要的原因是对耐盐降解性菌株的基础理论研究不够深入, 特别是耐盐降解性菌株的渗透调节机理和在高温环境中的营养条件缺乏研究, 对含盐生化处理的运行条件和运行参数的确定缺乏理论上的指导。

本文从含盐工业污水生化处理系统中分离到一株能耐受 0.5%~14% NaCl 并能以苯乙酸为惟一碳源生长的菌株 A1(*Arthrobacter* sp. A1), 并对其在高盐条件下的渗透调节进行了一系列的研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株

菌株 A1(*Arthrobacter* sp. A1) 为芳烃化合物降解菌, 能在 NaCl 浓度为 $0.1 \sim 2.0 \text{ mol L}^{-1}$ 以苯乙酸为惟一碳源的基础培养基中生长或在 NaCl 浓度为 $0 \sim 2.4 \text{ mol L}^{-1}$ 的完全培养基中生长。

1.2 培养基

完全培养基($\rho_{\text{g}}^{-1} \text{ L}^{-1}$): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 根据实验需要添加, pH 7.5; 基础培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, K_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 0.6, MgSO_4 0.1, CaCl_2 0.1, 苯乙酸 0.6, NaCl 根据实验需要添加, pH 7.5。

1.3 方法

细胞内的可溶性有机物的提取参照文献[2]; 总游离氨基酸含量的测定: 茚三酮比色法; 总游离氨基酸库的全氨基酸分析: 日立 835-50 型氨基酸自动分析仪; QAC 含量的测定: 碘结晶沉淀法参照文献[3]; K^+ 的提取和测定: 菌液于 6000 r min^{-1} 离心 15 min, 菌泥加入去离子水 25 ml, 混匀, 沸水浴 10 min,

* 国家高技术研究计划 863 资助项目(项目编号: 2001AA214121); 江苏省环境保护厅资助项目(苏环科项目文号: 2000.21 文)

- 通讯作者

收稿日期: 2001-07-29; 收到修改稿日期: 2002-01-22

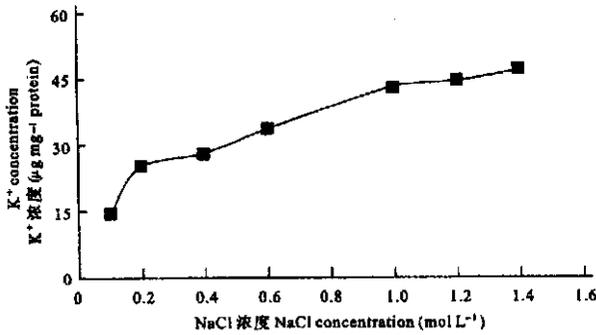


图1 NaCl浓度对菌株A1细胞内K⁺含量的影响
Fig. 1 Effect of concentration of sodium chloride on the accumulation of intracellular K⁺ in strain A1

12 000 r min⁻¹离心 20 min, 上清液定溶至 50 ml 备用; 测定采用火焰原子发射法, 参照文献[1]; 蛋白质含量的测定: 双缩尿法, 以牛血清蛋白作为标准。

2 结果与讨论

2.1 菌株 A1 在不同盐浓度条件下其体内 K⁺ 的含量与盐浓度的关系

菌株 A1 生长在 NaCl 浓度为 0.1 mol L⁻¹ 的苯乙酸基础培养基中, 其体内的 K⁺ 含量为 14.4 μg mg⁻¹ 蛋白质, 而生长在 NaCl 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、1.0、1.2、1.4 mol L⁻¹ 时, 菌株 A1 体内的 K⁺ 含量分别为 25.5、28.0、33.4、42.9、44.5 和 46.9 μg mg⁻¹ 蛋白质, 分别上升了 1.8、1.9、2.3、3.0、3.1 和 3.3 倍。说明随着培养基

盐浓度的升高, A1 细胞内积累较高浓度的 K⁺, 如图 1。

2.2 菌株 A1 在不同盐浓度条件下其体内游离氨基酸的含量与盐浓度的关系

菌株 A1 生长在含 0.1 mol L⁻¹ NaCl 苯乙酸基础培养基中, 其体内的总游离氨基酸含量为 51.6 μg mg⁻¹ 蛋白质。当培养基中的 NaCl 浓度升高到 1.0 mol L⁻¹ 时, 其体内的游离氨基酸含量上升到 103.2 μg mg⁻¹ 蛋白质, 增加 2 倍, 如图 2。

为考察在盐浓度升高条件下, 细胞体内哪几种氨基酸含量得到了增加, 利用氨基酸自动测定仪对菌株 A1 细胞内游离氨基酸库的 17 种主要氨基酸在不同盐浓度下的含量进行了分析, 结果如表 1。

从表 1 可以发现在菌株 A1 的游离氨基

酸库中, 其中谷氨酸占总氨基酸库的 72.6%, 当培养基盐浓度从 0.1 mol L⁻¹ 升高到 1.0 mol L⁻¹ 和 1.4 mol L⁻¹ 时, 其体内的谷氨酸含量从 32.40 μg mg⁻¹ 蛋白质分别增加到 68.66 和 84.21 μg mg⁻¹ 蛋白质, 说明游离氨基酸库的增加主要来自谷氨酸的增加。但谷氨酸在总游离氨基酸库中所占的比例却略有下降 (在 1.0 mol L⁻¹ 和 1.4 mol L⁻¹ NaCl 条件下, 谷氨酸所占的比例分别为 64.76% 和 72.1%)。

在盐浓度增加后, 增加较多的氨基酸还有胱氨酸、酪氨酸和天门冬氨酸, 其中天门冬氨酸在培养基盐浓度为 0.1 mol L⁻¹ 时, 菌株 A1 体内的天门冬氨酸含量很低, 未能检测到, 而当培养基盐浓度升高到 1.0 mol L⁻¹ 后, 其体内游离天门冬氨酸急剧增加到 17.7 μg mg⁻¹ 蛋白质。说明天门冬氨酸对菌株 A1 的渗透生理调节也有比较重要的作用, 有些氨基酸的含量变化不大, 如缬氨酸。还有些氨基酸, 在培养基中盐浓度增加后, 其含量反而下降, 如苏氨酸、苯丙氨酸等。

据文献报道, G⁻ 细菌和 G⁺ 细菌在正常条件下, 其体内的游离氨基酸库含量并不一样, G⁻ 细菌具有一个几乎完全由谷氨酸组成的低总量氨基酸库, 而 G⁺ 细菌则具有一个较大的游离氨基酸库 (同样是谷氨酸占很大的比例), 而在高盐浓度条件下, G⁻ 细菌主要积累谷氨酸, G⁺ 则主要积累脯氨酸作为调渗物质。菌株 A1 在低盐环境中, 总游离氨基酸含量较高, 达到了 44.6 μg mg⁻¹ 蛋白质, 这和 G⁺ 的特点相一致, 但在高浓度盐环境中, 其细胞内积累的氨基酸是谷氨酸和天门冬氨酸而非脯氨酸, 这一点又和 G⁻ 细菌相似。说明菌株 A1 菌在高盐环境中的渗透调节机制有其独特的地方。

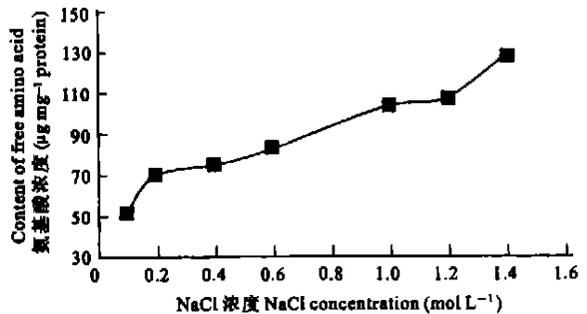


图2 NaCl浓度对菌株A1细胞内游离氨基酸含量的影响
Fig. 2 Effect of concentration of sodium chloride on the accumulation of intracellular free amino acid in strain A1

表 1 不同盐浓度对菌株 A1 细胞内游离氨基酸组成的影响

Table 1 Effect of concentration of sodium chloride on the intracellular free amino acid composition of strain A1

氨基酸 Amino acid	氨基酸浓度 Amino acid concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$ protein)		
	0.1 mol L ⁻¹ NaCl	1.0 mol L ⁻¹ NaCl	1.4 mol L ⁻¹ NaCl
天门冬氨酸 Asp	N. D.	17.70	19.47
苏氨酸 Thr	2.37	N. D.	N. D.
丝氨酸 Ser	N. D.	N. D.	N. D.
谷氨酸 Glu	32.40	68.66	84.21
甘氨酸 Gly	0.44	N. D.	0.53
丙氨酸 Ala	0.40	1.00	0.89
胱氨酸 Cys	N. D.	1.80	1.63
缬氨酸 Val	1.89	1.68	2.32
蛋氨酸 Met	0.62	2.94	3.42
异亮氨酸 Ile	0.44	1.38	N. D.
亮氨酸 Leu	0.31	1.50	N. D.
酪氨酸 Tyr	N. D.	0.84	1.21
苯丙氨酸 Phe	3.48	N. D.	N. D.
赖氨酸 Lys	1.50	0.96	1.79
组氨酸 His	N. D.	0.60	N. D.
精氨酸 Arg	0.79	3.24	1.37
脯氨酸 Pro	N. D.	3.84	N. D.
游离氨基酸总量	44.64	106.14	116.84
谷氨酸%	72.6	64.7	72.1
谷氨酸+ 天门冬氨酸%	72.6	81.4	88.7

N. D. = Not detected

2.3 菌株 A1 在不同盐浓度条件下其细胞内季铵化合物(Quaternary ammonium compounds, QAC) 的含量与盐浓度的关系

采用 QAC- 碘结晶沉淀法测定了菌株 A1 细胞内的 QAC 随盐浓度变化的积累关系。该测定方法的原理是在强酸性条件下($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), 在样品的高氯酸提取液中加入 $\text{I}_2\text{-IK}$, 形成 QAC- 碘结晶沉淀, 离心, 沉淀用 1,2- 二氯乙烷溶解后于 365 nm 测定 OD(碘的吸收峰), $\text{OD}_{365\text{nm}}$ 和样品中的 QAC 含量呈正相关^[3]。从图 3 上看, 在培养基中盐浓度为 0.1 mol L^{-1} 时, 其 QAC 的 $\text{OD}_{365\text{nm}}$ 为 0.292。当培养基中盐浓度上升时, 其细胞内 QAC 的含量也随之上升, 到盐浓度为 1.0 mol L^{-1} 时, 其细胞内的 QAC 的 $\text{OD}_{365\text{nm}}$ 上升到了 1.94。比盐浓度为 0.1 mol L^{-1} 条件下增加约 6.7 倍。

这说明 QAC 在菌株 A1 的耐盐渗透生理调节中扮演了相当重要的角色。从 QAC 的结构和性质上看, QAC 如甜菜碱本身为氨基酸衍生物, 其 N 上 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 QAC 要比积累氨基酸和 K^+ 效率更高。当外界盐浓度从 0.2 mol L^{-1} 上升到 0.6 mol L^{-1} 时, 菌株 A1 细胞内的 QAC 含量只增加 29.3%, 而当盐浓度从 0.6 mol L^{-1}

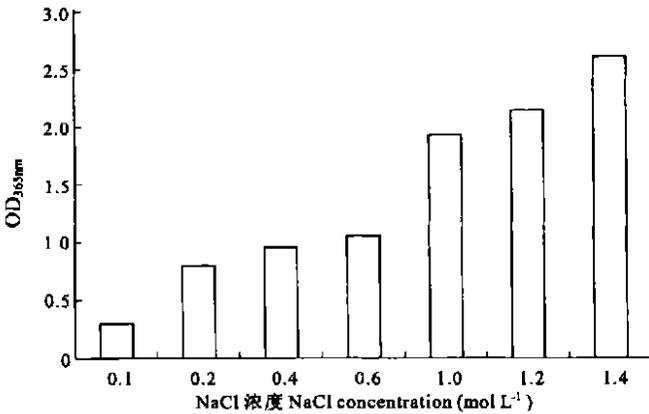


图3 NaCl浓度对菌株A1细胞内QAC相对含量的影响

Fig. 3 Effect of concentration of sodium chloride on the accumulation of intracellular QAC in strain A1

每隔 20 min 取样,测定其细胞内的总氨基酸和 QAC 含量变化,结果如图 4 所示,菌株 A1 在受到 1.0 mol L^{-1} NaCl 冲击后,其细胞内的氨基酸和 QAC 含量急剧上升,在 40 分钟内其细胞内的游离氨基酸和 QAC 分别上升了 2.1 倍和 4.9 倍,60 min 后其细胞内积累的游离氨基酸和 QAC 含量即达到了其在 1.0 mol L^{-1} NaCl 培养基中生长时的平衡浓度。说明菌株 A1 对外界盐浓度的变化的反应相当灵敏,在很短的时间内就调整细胞内的调渗透物质的含量来适应外界渗透压的变化。

3 讨论

菌株 A1 分离于混合液盐浓度为 2%~7% 且运行良好的活性污泥池,为耐盐活性污泥的优势菌,其数量达到了 $10^{11} \text{ cfu g}^{-1} \text{ VSS}$ 。在基础培养基中其耐盐范围为 0.5%~12%。A1 的生长环境既不同于某些耐盐根瘤菌生长环境(盐碱地,盐浓度约为 $0.5 \sim 0.8 \text{ mol L}^{-1}$),也不同于极端嗜盐的古细菌生长环境(盐浓度 15% 到饱和)。其生长环境的盐浓度类似于海水属于中等水平,但由于污水排放的不稳定性,混合液盐浓度经常处于急剧的变化之中。这就要求 A1 不但要能耐受较高的盐浓度,还要适应急剧的盐浓度变化。从我们的实验结果,A1 靠积累多种而不是单一的调渗透物质来适应高盐环境,且各种调渗透物质的含量能随外界盐浓度的变化而快速调整。这与其生长的环境是相适应的。

从这三种调渗透物质对细胞内渗透压的贡献来看,QAC 在盐激条件下增加最多,显然是主要的调渗透物质。而 K^+ 和谷氨酸的增加量相差不大,可能是出于相互中和电荷的需要。 K^+ 、谷氨酸和 QAC 之间

增加到 1.0 mol L^{-1} 时,QAC 含量则增加了 104%,是前者的 3 倍,说明菌株 A1 在环境中盐浓度较高时,确实倾向于积累 QAC。

从上面的分析,我们可知在环境中盐浓度升高时,菌株 A1 在其细胞内积累 K^+ 、游离氨基酸和 QAC 作为调渗透物质来抗衡外界的高渗环境,维持细胞内足够的渗透压,使细胞能进行正常的代谢活动。

2.4 盐激条件下 A1 细胞内游离氨基酸和 QAC 含量的变化

接种菌株 A1 于含 0.1 mol L^{-1} NaCl 的苯乙酸基础培养基中培养到对数生长期后期,突然加入 NaCl 使培养基中最终 NaCl 浓度为 1.0 mol L^{-1} ,

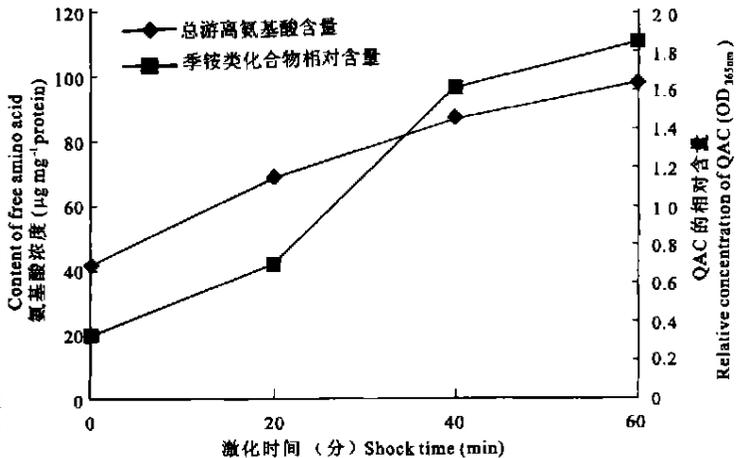


图4 盐激条件下菌株A1细胞内氨基酸和QAC含量的变化

Fig. 4 Change of intracellular free amino acid and QAC contents under salt shock condition

的相互影响关系和调控机制目前还不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

1. 国家环保局等编. 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
2. Tempest D W, Meers J L. Influence of environment on the free amino acid pool content of bacteria. J. General Microbial, 1970, 60: 213~ 217
3. Grieve C M, Gattan S R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and soil, 1983, 70: 303~ 307
4. Yancey P H, Clark M E, Hand S C, *et al.* Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science, 1982, 217: 1 214~ 1 222
5. Measures J C. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature(London), 1975, 257: 398~ 400
6. Le Rudulier D, Strom A R, Dandekar A M, *et al.* Molecular Biology of Osmoregulation. Science, 1984, 224: 1 064~ 1 068
7. Linda Tombras, Jean-allain Pocard. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in rhizobium melliloti. Journal of Bacteriology, 1988, 170(7): 3 142~ 3 149
8. Postma P W, Keizer H G, Koolwijk P. Transport of trehalose in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, 1986, 168 (3): 1 107~ 1 111
9. Tempest D W, Meers J L. The influence of NaCl concentration of the medium on the potassium content of *Aerobacter aerogenes* and on the interrelationships between potassium, magnesium and ribonucleic acid in the growing bacteria, J. General Microbial, 1968, 54(3): 319~ 325
10. Landfald B, Strom A R. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1986, 165(3): 844~ 855
11. Le Rudulier D, Bernard T, Bouillard L. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. Appl. Environ. Microbiol, 1983, 46(1): 152~ 159

THE OSMOREGULATION MECHANISM OF SALT-TOLERANT STRAIN A1 (*ARTHROBACTER* sp. A1)

He Jian Hong Qing Li Shun-peng Cui Zhong-li Gu Xiang-yang Liu Zhi
(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Summary

A bacterial strain A1 was isolated from activated sludge that treat with hypersaline waste water and identified as *Arthrobacter* sp. this strain was capable of growing on MM with the NaCl contents $0.1 \text{ mol L}^{-1} \sim 2.0 \text{ mol L}^{-1}$ and phenyl acetic acid as the sole source of carbon and energy. The osmoregulation mechanism of this strain was studied, it was found that the intracellular accumulation of K^+ ; free amino acid; QAC increased with the increasing of salinity. The intracellular amino acid and QAC contents increased immediately when salt was added suddenly to culture to a final content of 1.0 mol L^{-1} . The contents of amino acid and QAC increased by 2.1 times and 4.9 times respectively in 40 minutes.

Key words Osmoregulation, QAC, Free glutamate, K^+