

细菌饥饿存活研究进展

梅志平* 章宗涉

(上海师范大学生物系 上海 200234)

关键词 细菌, 饥饿存活, 蛋白质

分类号 Q939.1

过去,我们对细菌生理、生态学的研究主要依赖人工细菌培养基。与人工培养基相比,自然界的营养条件对细菌的生长具有严重的限制作用。土壤中生物可利用有机碳的含量在0~1cm深度内只占总有机物质的0.5%~1.0%。海洋水体中有机物质的浓度在0.5~0.8mg/L之间,其中大部分是细菌无法利用的。土壤细菌年周转次数只有1~36代^[1]。

Morita把细菌在缺乏产能基质的环境中的存活称为饥饿存活^[2]。细菌饥饿存活将是微生物生理、生态学研究的重要内容。

1 关于细菌活力的定义

判断细菌活力的标准目前尚未统一。Marson把细菌的活性分为四类:1.死亡细菌:细菌仍具细胞壁,但缺乏任何代谢活性;2.非可繁殖细菌:缺乏繁殖能力,但仍有代谢活性的细菌;3.休眠细菌:在形式上一种形成孢子(结构性休眠),一种不形成孢子,只是代谢停顿(外源性休眠);4.活细菌:能活跃同化基质、繁殖并增加生物

* 现在工作单位:上海水产大学农业部水产增养殖生态、生理重点开放实验室,上海 200090
1997-02-07收稿

量的细菌^[3]。Kaprelyants将细菌活性分为三类^[4]。Kaprelyants^[4]和Roszak & Cowell^[5]均把非可培养活细菌归入休眠细菌。现在更多地趋向于只要具有呼吸链活性(ETS活性)即可称作为活细菌,而不考虑能否在固体培养基上形成菌落^[6,7],这对我们传统的活细菌计数提出了质疑,有关细菌的非可培养状态与其活力之间的关系可参阅文献[8]。

本文暂且把能在固体培养基上形成菌落者称为可培养活细菌,而在固体培养基上不能直接形成菌落,但经复苏培养后能形成菌落者称为休眠细菌,在饥饿条件下处于上述状态者统称为饥饿存活细菌。

2 细菌从增长期向静止期转变时的饥饿存活过程

自对数增长期结束进入静止期时,外界营养物质消耗殆尽,细菌转向内源性营养,消耗体内的能量储藏物质或其它细胞成份,标志着饥饿存活过程的开始^[5,9]。

细菌的能量储藏物质可分为四类:即碳水化合物(多聚葡萄糖、糖原)、类脂[包括聚- β -羟基丁酸(PHB)和Polykanoates]、多聚磷酸盐和蓝藻颗粒体/藻蓝蛋白^[10]。细菌体内积累的能量储存物质的种类还与培养条件有关,如在氮限制的培养基中,*Benecka natriegen*将过多的葡萄糖转化成糖原,而在碳-限制的培养基中,则很少积累糖原^[11]。

有些种类的细菌不具备合成能量储存物质的能力,它们在饥饿条件下依赖细胞内蛋白质和RNA等大分子物质的降解获得所需的能量^[2],如*E. coli*和*Vibrio* spp.^[12,13]。但这些大分子物质的分解与细菌存活之间的关系不象能量储存物质的消耗与细菌存活之间的关系那样清楚。

细菌体内能量储存物质几乎在进入饥饿状态的数小时内被耗尽,但是,这种内源性代谢提供了细菌进入饥饿环境后进行细胞重组组织所需的能量^[9]。

以*Vibrio* sp. Strain CCUG 15956为例,细胞重组组织过程经历三个阶段:第一阶段为移入饥饿培养基的最初40min,细菌发生约束反应,细胞内积累鸟苷四磷酸(ppGpp),同时RNA和蛋白质的合成速率降低;1~3h之间为第二阶段,ppGpp含量降低,RNA和蛋白质的合成速率再次上升;第三阶段为3h以后,细胞内所有大分子物质的合成速率下降。整个过程所需能量来自于能量储存物质的内源性代谢^[14]。

细菌在细胞重组组织过程中,引发合成多种饥饿蛋白质。*Vibrio* sp. Strain CCUG15956在此阶段引发合成66种饥饿蛋白质^[14]。饥饿蛋白质是从头合成的,而不是原有蛋白质修饰分解的产物^[15]。开始合成的饥饿蛋白质保证饥饿环境中细胞的完整性,后期合成的蛋白质为细菌遇到适宜环境时恢复(或复苏)而准备^[16,17]。

饥饿过程中新合成的蛋白质包括6种周质蛋白、9种外膜蛋白和4种质膜蛋白质^[18]。外膜饥饿蛋白的合成还提高了细胞表面的粘附能力。饥饿细菌粘附于固体基质的表面也有利于它们的长期存活^[15]。Albertson检测出了两种海洋细菌(*Vibrio* sp. 和另一种G⁻运动细菌)在饥饿过程中产生饥饿特异抗原,这种饥饿特异抗原可能与饥饿过程中合成的外膜蛋白质和周质蛋白质有关^[19]。

细菌进入饥饿环境后,经细胞重组组织,不但可以忍受饥饿的营养环境,而且增强了对其它胁迫因子如温度冲击、氧化环境、渗透压改变等的抵抗能力,这种现象被称为交叉保护^[17,20]。

最近Munro发现*E. coli*和*Salmonella typhimurium*存活以及对多种胁迫因子的抵抗力的形成均不能离开Rpos(δ 因子)^[21]。细菌饥饿存活的分子生物学基础在有关文献中已有详细的讨论^[9,22]。

3 细菌在饥饿环境中的长期存活和休眠

细菌在长期饥饿存活过程中,相应改变代谢对策。过去认为假单胞菌属种类不能发酵葡萄糖和其它糖类,但Jorgensen & Tiedje将两种海洋反硝化细菌*Pseudomonas aeruginosa* PAO1和*P. fluorescens* ATCC17822在电子受体(O₂和NO₃⁻)饥饿条件下培养3个月,用¹⁴C葡萄糖标记后发现¹⁴C出现在细胞体内、¹⁴CO₂和发酵产物中^[23],通过发酵所获得的能量足够用于维持生存。

在厌氧饥饿条件下,甲烷营养细菌的存活明显优于在好氧条件下的^[24]。该菌在好氧和厌氧饥饿条件下分别利用不同的基质。在好氧饥饿条件下,优先利用的内源性代谢基质为蛋白质和类脂;而在厌氧饥饿条件下,仅利用细胞内的低分子量有机化合物,而细胞内蛋白质、类脂、多糖和核酸等大分子量化合物含量无显著变化^[25]。这反映了由于饥饿细菌能量利用率低,好氧条件下细菌产能量大,使得产能量与利用量不能偶合。产能和耗能过程不能偶合则加快细菌死亡^[26]。因此在

厌氧条件下发酵产能是细菌对长期饥饿环境代谢适应的对策之一。

细菌在饥饿条件下的存活能力依不同种类而异^[27]。而且,生长速率越快,在饥饿条件下丧失活力也越快^[28]。细菌增长速度降低到一定程度,其维持代谢趋近于 0,从而进入休眠状态^[39]。

关于非孢子形成细菌在实验条件下的休眠状态报道尚不多。*Micrococcus luteus* 在饥饿条件下进入休眠状态,呈非可培养状态,但用流式细胞计数仪测得休眠细菌具有吸收 Rhodamine 123 的活性,证明休眠细菌的呼吸链仍然是完整的^[30]。

Micrococcus luteus 进入休眠状态后,细胞质变得更加致密,细胞壁增厚,并保持较好的完整性。细胞壁脂类成分发生了变化,因而流动性降低,细胞内 DNA 含量基本保持不变,与能量代谢有关的酶仍具有很高的潜在活性^[30]。

可以看出,非孢子形成细菌的休眠有三个特征:(1)它们保存着完整的呼吸链,但不能在普通固体培养基上形成菌落;(2)它们不但能忍受饥饿而且还提高了对其它胁迫环境,如高盐度,渗透压改变和高温等的忍受能力;(3)由于休眠细菌仍保持着代谢系统的完整性,一旦遇到适宜的营养环境仍可恢复生长^[4]。由此可见,非孢子形成细菌的休眠与孢子形成细菌的休眠现象^[11]有相似之处。

4 休眠细菌的复苏

休眠细菌由于仍然保存着完整的代谢系统,一旦遇到适宜营养条件,即可复苏。休眠细菌复苏前要经历一个延滞期,*Vibrio* sp. 复苏前的延滞期与饥饿时间呈正比^[32]。*Micrococcus luteus* 复苏前延滞期与种群内初始可培养活菌数有关,初始可培养活菌数越多,延滞期越短,复苏也越快,因此推测群体内可培养活菌可分泌一种信息素促进休眠细菌的复苏^[31]。

休眠细菌的复苏是一个活跃代谢的过程。*Vibrio* sp. 在复苏过程中,细胞体积不断增大,同时细胞内 RNA、DNA 和蛋白质含量呈指数增加^[33]。在低温(5℃)且饥饿状态下进入休眠状态的 *Vibrio vulnificus*,在室温下培养 5d 后,30% 的细菌恢复在固体培养基上形成菌落的能力。在复苏过程中,进行活跃的蛋白质和肽聚糖的合成^[34]。

Albertson 用二维电泳分析表明经饥饿培养的

Vibrio sp. S14 在加入葡萄糖最低培养基后,原先形成的饥饿蛋白质消失,而出现了成熟蛋白质(Mat),一旦再次进入生长状态,成熟蛋白质也相继消失。推测这些蛋白质是分解原先合成的饥饿蛋白质的酶,这有利于建立快速利用外界营养物质的代谢系统^[35]。休眠细菌的复苏过程也是一个细胞重组组织的过程。

成熟蛋白质的合成须由 RNA 来转录,但并不需要 RNA 从头合成,而是依赖细胞内过量存在的 rRNA 和核糖体^[19]。*Vibrio* spp. 在饥饿 15d 以后,细胞内仍保留着 10%~26% 的 rRNA^[14]。因此,rRNA 的保存是细菌维持复苏能力的重要条件之一。

5 总结与展望

细菌的饥饿存活是自然界的一种普遍现象。经生理上的调整后,细菌可以在营养供应不足的饥饿环境中长期存活。细菌饥饿存活的研究范围还相对狭窄,所涉及的菌种尚局限在少数门类。今后还应在更广范围内对不同门类细菌开展研究,才能全面了解细菌的饥饿存活机制。

饥饿存活是细菌对环境的一种适应机制,也是保证物种在特定环境延续的一种生存对策。研究细菌的饥饿存活对于了解细菌群落在生态系统内的贡献具有重要意义。由于饥饿存活的细菌抗逆力提高,因此为了有效杀灭病原菌,应采取相应的对策。细菌在饥饿存活过程中不断缩小体积,形成超小细菌,扩大比表面积,提高了对营养物质的亲和能力。超小细菌在分解、吸收水中油污污染的应用上取得了良好的效果^[36]。在活菌制剂的开发研制过程中,可应用细菌饥饿存活的原理,延长保存时间,提高存活水平。因此研究细菌的饥饿存活,在理论上和应用价值上均有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Morita R Y. Can J Microbiol, 1988, 34:436~441.
- [2] Morita R Y. Advances of Microbial Ecology, 1982, 6:171~198.
- [3] Marson C A, Hamer G, Bryers J D. FEMS Microbiol. Rev, 1986, 39:373~401.
- [4] Kaprelyants A S, Gottschal J C, Kell D B. FEMS Microbiol Rev, 1993, 104:271~286.
- [5] Roszak D B, Cowell R R. Microbiol Rev, 1987, 51:365~379.
- [6] Tabor P S, Neihof R A. Appl Environ Microbiology, 1982, 43:1249~1255.

- [7] Zimmermann R, Iturriaga R, Becker-Birck J. Appl Environ Microbiol, 1978, 36:926~935.
- [8] 纪伟尚, 许兵, 徐怀恕. 微生物学通报, 1990, 17: 362~364.
- [9] Kolter R, Siegle D A, Tormo A. Ann Rev Microbiol, 1993, 47:855~874.
- [10] Daws E A. In Bacteria in their natural environments. Society for General Microbiology, P. 43~79. 1985.
- [11] Nazly N, Carter I S, Knowles C J. J Gen Microbiol, 1980, 16:295~303.
- [12] Davis B D, Luger S M, Tai P C. J Bacteriol, 1986, 166:439~445.
- [13] Kramer J G, Singleton F L. Appl Environ Microbiol, 1992, 58:201~207.
- [14] Nystrom T, Flardh K, Kjelleberg S. J Bacteriol, 1990, 172:7058~7092.
- [15] Kjelleberg S, Hermansson M, Marden P, et al. Ann Rev Microbiol, 1987, 41:25~49.
- [16] Morton D S, Oliver J D. Appl Environ Microbiol, 1994, 60:3653~3659.
- [17] Nystrom T, Kjelleberg S. J Gen Microbiol, 1989, 135:1599~1606.
- [18] Albertson N H, Nystrom T, Kjelleberg S. J Gen Microbiol, 1990, 136:2195~2199.
- [19] Albertson N H, Jones G W, Kjelleberg S. J Gen Microbiol, 1987, 133:2225~2233.
- [20] Hartke A, Bouche S, Gansel X, et al. Appl Environ Microbiol, 1994, 60:3474~3478.
- [21] Munro P M, Flatan G N, Clement R L, et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:1853~1858.
- [22] Martin A, Auger E A, Blum P H, et al. Ann Rev Microbiol, 1989, 43:293~316.
- [23] Jorgensen K S, Tiedje J M. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:3297~3305.
- [24] Roslev P, King G M. Appl Environ Microbiol, 1994, 60:2602~2608.
- [25] Roslev P, King G M. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:1563~1570.
- [26] Daws E A. Microbial energetics. Blackie & Son Ltd, New York. 1986, 166~172.
- [27] Morita R Y. In Bacteria in their natural environment, Society for General Microbiology, 1985, 111~130.
- [28] Moyer C L, Morita R Y. Appl Environ Microbiol, 1989, 55:1122~1127.
- [29] Pirt S J. J Ferment Technol, 1987, 65:173~177.
- [30] Mukamolova G V, Yanopolskaya N D, Votyalya T. V, et al. Arch Microbiol, 1995, 163:373~379.
- [31] Moat A G. Microbial physiology. A Wiley-Interscience Publication. Jon Wiley & Son, New York, 1979, 545~567.
- [32] Amy P S, Oaykubg C, Morita R Y. Appl Environ Microbiol, 1983, 45:1685~1690.
- [33] Votyakova T V, Kaprelyants A S, Kell D S. Appl Environ Microbiol, 1994, 60:3284~329.
- [34] Nilsson L, Oliver J D, Kjelleberg S. J Bacteriol, 1991, 175:5054~5059.
- [35] Albertson N H, Nystrom T, Kjelleberg S. J Gen Microbiol, 1990, 136:2201~2207.
- [36] Lappin-Scott H M, Costerton J W. Current Opinion in Biotechnology, 1992, 3:283~285.