

一株高乙醇耐受的嗜热细菌 *Anoxybacillus* sp. WP06 的性质研究

彭惠, 高毅, 肖亚中

安徽大学生命科学学院, 合肥 230039

摘要: 厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)的菌株 WP06 是一株兼性厌氧的嗜热细菌, 能利用木糖、阿拉伯糖和葡萄糖等产生乙醇。不像绝大多数嗜热细菌, WP06 菌株在高温下表现出极高的乙醇耐受力, 60°C 时在 8% 的乙醇胁迫下才出现生长抑制现象, 15% 的乙醇胁迫下仍能生长, 是目前已知的乙醇耐受力最高的嗜热细菌。WP06 菌株突破了人们对高温下细菌耐受乙醇浓度的极限认识, 是研究高温下乙醇耐受机制的良好出发菌株。

关键词: 嗜热细菌, 乙醇耐受

The High Ethanol Tolerance in a Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus* sp. WP06

Hui Peng, Yi Gao, and Yazhong Xiao

School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: *Anoxybacillus* sp. WP06 is a thermophilic (optimum temperature for growth, 60°C), facultative anaerobe. Strain WP06 is able to utilize a wide range of carbon sources such as glucose, xylose, arabinose, starch, maltose and sorbitol. Anaerobically, glucose and xylose were fermented to ethanol as minor products. Unlike most thermophilic bacteria isolated to date, strain WP06 is tolerant (maintained viability) to high ethanol concentrations up to 15% at 60°C. The growth rate was slightly inhibited at 8% ethanol. The observation that strain WP06 exhibits higher tolerance of 15% ethanol at 60°C exploits the level of ethanol tolerance in thermophilic bacteria. Strain WP06 may be candidate for mechanisms of ethanol tolerance in thermophilic bacteria.

Keywords: thermophilic bacterium, ethanol tolerance

石油、煤炭等不可再生能源日益枯竭, 生物质能源化是当前世界各国能源领域研究的热点。与常温的酵母菌和运动发酵单胞菌相比, 一些产乙醇的嗜热细菌具有独特的优势。例如, 它们不仅能直接转化木质纤维素, 而且可以边发酵边蒸馏节约能耗、不易污染杂菌、对酸的耐受力高、生长速度快。

因此, 近年来嗜热细菌在生物燃料乙醇方面的潜在应用价值受到极大重视^[1]。但是, 较低的乙醇耐受力 (5% [V/V]) 制约了嗜热细菌的乙醇发酵水平, 是目前嗜热细菌应用于工业生产的最大障碍。

与常温细菌相比, 早先发现的嗜热细菌的乙醇耐受力都较低。研究温度与乙醇耐受力关系的报道

Received: March 22, 2008; **Accepted:** April 11, 2008

Supported by: The Provincial Program of Natural Science of Anhui Higher Education (No.KJ2008B202); The Program of Faculty Enhancement for Doctor and Master from Anhui University (No.02203104).

Corresponding author: Yazhong Xiao. E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

安徽高校省级自然科学基金项目(No.KJ2008B202); 安徽大学博硕士队伍建设计划(No. 02203104)。

指出,乙醇耐受力会随温度的增加急剧降低,主要原因是质膜的流动性随温度升高而加强,致使高温下乙醇更容易瓦解质膜^[2]。因此,过去人们普遍认为嗜热细菌不可能有高的乙醇耐受力。最近,国外相继报道的一些高乙醇耐受力的嗜热细菌。例如,2006年 Fong 报道的 *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG 在 60°C 下的乙醇耐受力高达 10%^[3],2007年 Georgieva 报道的 *Thermoanaerobacter* BG1L1 在 70°C 下的乙醇耐受力达到了 8.3%^[4]。这些新发现说明嗜热细菌在高温下可以具有高的乙醇耐受力。

我们首次对新发现的一株在 60°C 下乙醇耐受力高达 15% 的厌氧芽孢杆菌 WP06(*Anoxybacillus* sp. WP06)进行了性质研究,包括其形态和生理特性、乙醇耐受力和有机溶剂耐受力。初步研究结果如下。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

Anoxybacillus sp. WP06 筛选自云南腾冲热泉,由南京师范大学邵蔚蓝教授惠赠。

1.1.2 培养基与缓冲液

基本培养基采用嗜热细菌最简培养基(TMM)^[3]。1 L TMM 培养基由 920 mL 盐溶液、40 mL 1 mol/L MOPS 缓冲液 (pH 8.2)、10 mL 1 mmol/L FeSO₄、10 mL 0.132 mol/L K₂HPO₄、10 mL 0.953 mol/L NH₄Cl、10 mL 去离子水混合而成。盐溶液的配方为 5 g NaCl、1.47 g Na₂SO₄、0.08 g NaHCO₃、0.25 g KCl、0.04 g KBr、1.87 g MgCl₂·6H₂O、0.41 g CaCl₂·2H₂O、0.008 g SrCl₂·6H₂O、0.008 g H₃BO₃、0.9 g NaNO₃,定溶至 1 L。碳源利用的分析培养基为在 TMM 培养基中添加 1% 的碳源。缓冲液有乙酸-乙酸钠、磷酸盐、Tris-Cl、甘氨酸-NaOH 等缓冲液。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的培养

在亨盖特管中厌氧培养,好氧培养在摇床上 100r/min 培养。碳源利用情况在好氧条件下测定。

1.2.2 乙醇耐受性测定

为了防止乙醇挥发,培养在密封的亨盖特管中进行。使用 1% 葡萄糖的液体 TMM 培养基,添加不同浓度的乙醇后按 2% 的接种量接种,60°C 下培养。

1.2.3 有机溶剂耐受性测定

收集对数生长期的 WP06 菌株,用 0.9% NaCl 的生理盐水重悬(约为 10⁷ 个/mL),取 5 mL 菌悬液涂布固体平板,待自然风干后加入有机溶剂,覆盖平板约 3 mm。为防止其挥发,用封口膜密封平板。平板在 60°C 放置 5 h,倒掉溶剂,倒置平板在 60°C 再培养 10 h。测试的有机溶剂包括甲苯、苯、二甲苯、正丁醇、乙酸乙酯、异丙醇、庚烷、丙酮和甲醇。

1.2.4 乙醇定量分析

用气相色谱法测定(岛津 GC-17A),HSS-4A 顶空进样装置。色谱柱:DB-1 大口径毛细管柱(30 mm × 0.53 mm × 1.5 μm);柱温:50°C;气化室:140°C;检测器:FID,250°C;载气:N₂,5 mL/min;顶空设置:VIAL 75°C;SYRINGE 75°C;COND. TIME 20 min;ANAL. TIME 5 min。顶空进样量 300 μL。

2 结 果

2.1 WP06 的形态和生理特性

WP06 菌株稀释后涂布于添加 1% 葡萄糖的 TMM 固体平板,培养 4 h 后开始形成不透明的奶白色菌落。其菌体显微形态如图 1 所示,为典型的厌氧芽孢杆菌。虽然 WP06 菌株是在严格厌氧条件下进行筛选获得,但是 WP06 菌株在好氧条件下也能生长,为兼性厌氧的嗜热细菌。WP06 菌株革兰氏染色阳性,最大 NaCl 生长抑制浓度为 0.5%。代谢底物广泛,能利用木糖、阿拉伯糖、葡萄糖等产生乙醇。WP06 菌株的碳源利用情况如表 1 所示。



图 1 对数生长期的 WP06 菌株的显微镜照片
Fig. 1 Normal micrographs of strain WP06 at the exponential growth phase

WP06 菌株的生长温度和生长 pH 如图 2 所示。由图 2 可见,其生长温度范围为 40~75°C,最适生长温度为 60°C;其生长 pH 范围为 6.5~11.5,最适生长 pH 为 8.5。在最适生长温度和最适 pH 条件下,以 1% 的接种量转接,其生长曲线如图 3 所示。可见,该菌株生长速度很快,只需 4.5 h 即可进入生长稳定期。

表 1 WP06 菌株的碳源利用
Table 1 Substrates of strain WP06

Sugars utilized	WP06
Galactose	+
Sucrose	+
Starch	+
Lactose	-
D-sorbitol	+
Maltose	+
Fructose	+
Xylose	+
Arabinose	+
Glucose	+

+: growth; -: no growth

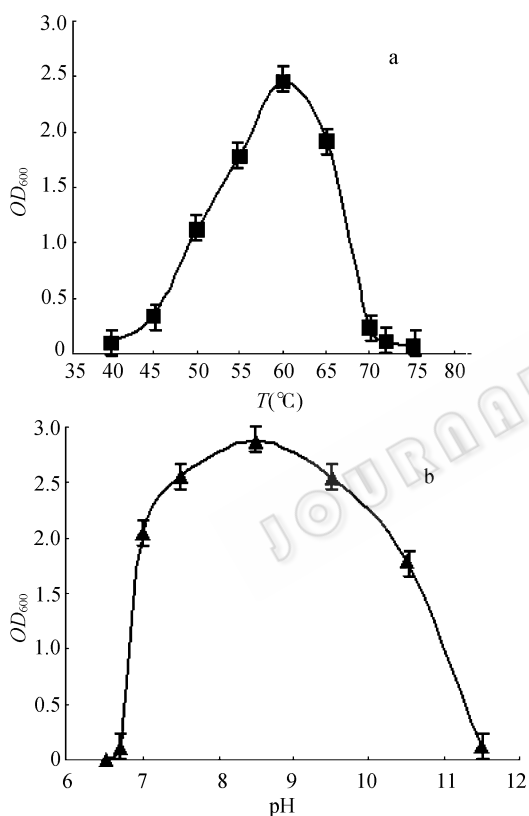


图 2 温度(a)和 pH(b)对细菌生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature (a) and pH (b) on cell growth

2.2 WP06 的乙醇耐受性

在 60°C 下, WP06 的乙醇耐受生长情况如图 4 所示。从图 4 可以看出, 4% 的乙醇对菌株生长无明显影响; 8% 时虽然最高 OD 值略有下降, 但生长速度基本不变。菌株的最高乙醇耐受力达到 15%。它与其它嗜热细菌的一些主要特征的比较结果见表 2。

2.3 WP06 的有机溶剂耐受性

有机溶剂对细胞的毒性主要是破坏质膜的结构和功能, 与乙醇的毒性机理类似。因此, 选择极性从大到小的 9 种有机溶剂检测了 WP06 菌株的有机溶剂耐受性, 结果如表 3 所示。WP06 菌株对极性系数 >4 的异丙醇、庚烷、丙酮和甲醇均有很好的耐受力; 对二甲苯和乙酸乙酯有一定的耐受力; 对极性系数 <3 的强极性有机溶剂无耐受。这说明 WP06 菌株有一定的有机溶剂耐受力。

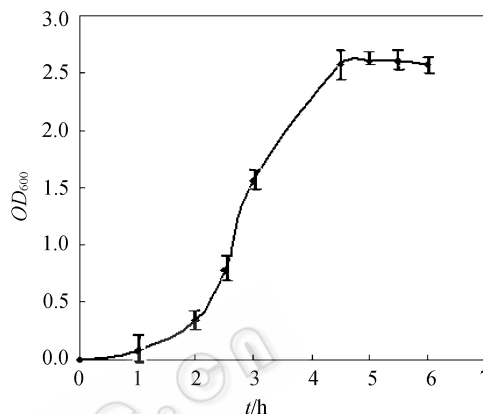


图 3 WP06 菌株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of strain WP06

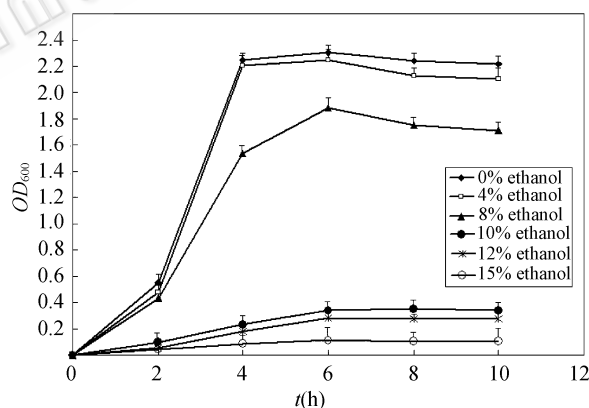


图 4 60°C 时培养基中添加不同浓度乙醇对 WP06 菌株生长的影响

Fig. 4 Growth of strain WP06 at different concentrations of ethanol (from 0 up to 15%, V/V) at optimum growth temperature of 60°C

3 讨论

乙醇耐受力是指在一定浓度的乙醇胁迫下微生物生存的能力。乙醇耐受力能维持菌体在乙醇胁迫下仍正常生长, 有助于提高菌株乙醇发酵产量。WP06 菌株分离自云南腾冲热泉环境样品, 其最大的特点是在高温下具有极高的乙醇耐受力, 60°C 下

表 2 菌株 WP06 与其它的潜在高温发酵乙醇菌株的比较
Table 2 Characteristics of strain WP06 and other potential thermophilic ethanologens

Strain	Characteristics					
	Aerobe or anaerobe	Gram staining	Temperature optimum (°C)	pH optimum	Ethanol tolerance % (V/V)	Fermentation end product ethanol(g/L)
WP06	Facultative anaerobe	+	60	9.0	15	0.3
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG ^[2]	Facultative anaerobe		60	7.0	10	0.4
<i>Thermoanaerobacter</i> BG1L1 ^[3]	Obligate anaerobe	+	70	7.7	8.3	2.7
<i>Thermoanaerobacter</i> A10 ^[2]	Obligate anaerobe	+	70	7.2	4.7	1.8
<i>T. ethanolicus</i> JW200 ^[5]	Obligate anaerobe	V	69	5.8~8.5	1.4	3.6
<i>T. mathranii</i> A3 ^[6]	Obligate anaerobe	V	70	7.0	5	0.8
<i>T. brockii</i> HTD4 ^[7]	Obligate anaerobe	+	70	7.5	1	1.0
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> ^[8]	Obligate anaerobe		55 60	ND	5	0.2
<i>C. thermocellum</i> ^[9]	Obligate anaerobe		62 65	6.4~7.4	5	0.7

+: Gram-positive; Gram-negative; V Gram-variable; ND No data

表 3 WP06 菌株的有机溶剂耐受性
Table 3 Organic solvent tolerance in strain WP06

Organic solvent	log P_{ow}	WP06
Toluene	2.5	-
Benzene	2.0	-
Xylene	3.1	±
n-Butanol	3.7	-
Ethyl acetate	4.3	±
Isopropanol	4.3	+
Heptane	4.5	+
Acetone	5.4	+
Methanol	6.6	+

+: confluent growth; ± some growth; - no growth

的乙醇耐受力达到 15%，比 *G. thermoglucosidasius* M10EXG 高出 5%^[3]。该菌株也是目前为止已知的乙醇耐受力最高的嗜热细菌。

乙醇为半极性溶剂，性能介于极性与非极性溶剂之间。对细胞的毒性主要表现为增加质膜的流性，破坏膜蛋白的功能。对常温菌乙醇耐受力研究表明，质膜的脂肪酸成分和膜蛋白的种类与乙醇耐受力密切相关。但是，乙醇对细胞的毒性会随温度的升高急剧增加，高温下的乙醇耐受机制鲜为人知。我们推测 WP06 菌株中具有特殊的机制可以在高温下抵御乙醇毒性。WP06 菌株的意义在于再次突破人们对高温下细菌耐受乙醇浓度的极限认识，是研究高温下乙醇耐受机制的良好出发菌株。

REFERENCES

- [1] Sommerl P, Georgieva T, Ahring BK. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose. *Biochem Soc Transa*, 2004, **32**: 283-289.
- [2] Georgieva TI, Skiadas IV, Ahring BK. Effect of temperature on ethanol tolerance of a thermophilic anaerobic ethanol producer *Thermoanaerobacter* A10: modeling and simulation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **98**: 1161-1171.
- [3] Fong GF, Svenson CG, Nakasugi K, et al. Isolation and characterization of two novel ethanol tolerant acultative aerobic thermophilic bacteria strains from waste compost. *Extremophiles*, 2006, **10**: 363-372.
- [4] Georgieva TI, Mikkelsen MJ, Ahring BK. High ethanol tolerance of the thermophilic anaerobic ethanol producer *Thermoanaerobacter* BG1L1. *Centr Euro J Biology*, 2007, **2**: 364-377.
- [5] Wiegel J, Ljungdahl LG. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol*, 1981, **128**: 343-348.
- [6] Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol*, 1997, **168**: 114-119.
- [7] Lamed R, Zeikus JG. Glucose fermentation pathway of *Thermoanaerobium brockii*. *J Bacteriol*, 1980, **141**: 1251-1257.
- [8] Lee CK, Ordal ZJ. Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *J Bacteriol*, 1967, **94**: 530-536.
- [9] Ng TK, Ben-Bassat A, Zeikus JG. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**: 1337-1343.