

烃的微生物摄取机制研究进展*

刘 晔 牟伯中** 刘洪来

(华东理工大学化学与制药学院 上海 200237)

摘要: 综述了近期在烃的微生物摄取机制方面的研究进展。对提高环境生物整治效果而言, 微生物对非水溶性底物, 尤其是烃的摄取机制是重要的课题。随着理论认识的深入和研究手段的丰富, 在该领域已有了更多发现和结论。介绍了表面活性剂对烃摄取的影响, 细胞表面性质的调整和烃的跨膜输送等方面的近期研究结果; 同时, 提供了细胞亚微结构分析, 细胞趋化性等相关证据, 指出了在该领域尚待解决的问题。

关键词: 烃, 微生物, 摄取, 表面活性剂, 细胞疏水性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0109-05

Advance in Mechanism of Alkane Uptake by Microorganism *

LIU Ye MU Bo-Zhong** LIU Hong-Lai

(School of Chemistry and Pharmaceutics, ECUST, Shanghai 200237)

Abstract: Recent advance in researches of alkane uptake by microorganisms was reviewed. To improve efficiency of bioremediation, knowledge of mechanism of water-insoluble substrate, especially alkanes, uptake by microorganism is badly needed. Powered by novel ideas and advanced techniques, more findings and conclusions were reported. Effects of surfactants on uptake of alkane, adjustment on cell surface properties and transport of alkane into the cells were discussed in this review, at the same time, evidences from analyses of cell ultra-structure and researches on cell chemotaxis were cited. There are still some questions in this area should be taken into consideration.

Key words: Alkane, Microorganism, Uptake, Surfactant, Surface hydrophobicity of cell

利用微生物降解环境中的石油污染物是经济 and 有效的环境整治手段。其中主要组分烃类通常难溶于水, 与此相矛盾的是, 微生物通常需要水作为媒介与环境进行物质交换。因此, 微生物如何摄入疏水性的底物对于生物化学和物理化学研究者来说都是具有吸引力的课题。

如果对微生物摄入烃的机制有更多了解, 就能发现微生物解烃过程中的限制性环节, 从而设计出针对性的措施大幅提高降解效率。微生物摄取烃的基本过程可分为 3 个阶段: 非水溶性的烃转化为可为微生物接纳的状态, 如乳化、增溶等; 烃传递到微生物细胞表面, 或者是微生物运动到可接触烃的区域; 烃跨膜 (壁) 输送, 进入细胞体。在 70 和 80 年代, 人们已经观测到细菌和酵母对液态烃及固态烃的摄取现象, 并推测了可能的摄取机制; 同时, 还提出了许多微生物利用烃生长的动力学模型。Man-

* 国家自然科学基金资助 (No. 50374038)

高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20030251002)

上海市教委资助项目

** 通讯作者 Tel: 021-64252063, E-mail: bzmu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-05-20, 修回日期: 2004-07-08

jeet 等对烃分子与微生物细胞表面的相互作用, 烃的跨膜传输以及细胞在利用烃生长时表形的变化等方面进行了回顾^[1]。随后, Hommel 和 Ratledge 提供了更为完善的综述^[2]。

然而, 到目前为止, 有关微生物摄入烃的机制还存在许多疑问。对微生物摄取烃的研究的重点, 从宏观的降解-生长试验, 转移到较微观的细胞与底物分子的相互作用上, 进而开始关注更微观的底物分子跨膜(壁)传输的通道和机制问题。因此, 近来又报道了许多重要的发现和推论。本文以微生物摄入烃的基本过程为线索, 介绍近期的研究思路和进展, 以期对相关领域基本轮廓做出概括, 并归纳出一些有待解决的问题。

1 微生物摄入烃的主要模式

一般认为, 微生物摄入烃可能通过以下 3 种模式: (1) 细胞直接摄取溶解在水相中的烃, 这种情况对于碳链长于 9 的烃不适用, 因为此时烃的溶解度在 10^{-5} g/L 以下; (2) 界面接触模式, 即细胞附着在体积远远大于其本身的油滴表面, 许多表面疏水性较强的细菌能够采用这种方式获取烃; (3) 表面活性剂介导模式, 即细胞表面附着许多体积远远小于本身的小油滴, 这种情况意味着体系中表面活性剂的浓度相当高, 以至于能够达到如此好的分散效果。

Bouchez-Naitali 等以细胞疏水性、发酵液界面张力及表面张力以及胞外糖脂类表面活性剂等作为考察标准, 对土壤环境中代表性的烃降解细菌分组, 发现 47% 的菌株不产表面活性剂, 完全采用界面接触模式; 而 53% 的菌株能够产生生物表面活性剂, 其中 11% 的菌株利用表面活性剂胶束所传递的烃, 42% 的菌株利用所产的表面活性剂增强了界面摄取^[3]。

2 微生物与烃的接触

2.1 烃在水相中的传递

作为微生物利用的底物, 烃的重要特征在于其非水溶性, 因此人们考虑最多的是烃在水相中的传质限制。对底物的超声波分散处理或在培养体系中施以机械搅拌在很多场合能够增进微生物的烃摄入效率, 然而机械作用导致高速的流体剪切又会使细胞不能良好的附着在油滴表面, 而使降解效率下降^[4]。在培养体系中添加角质素和甲壳素等多孔颗粒, 可大幅提高烃降解的效率。Leonardo 等的解释是新形成的水-细胞-油-固体颗粒界面比原来的水-细胞-油界面有更好的传质效果^[5]。

一般来说, 表面活性剂能够改善烃的生物可利用性。一方面, 能使液相中烃更分散, 从而增大水相和油相界面的面积; 另一方面, 能将固体颗粒上吸附的烃洗脱下来, 使之进入水相中, 从而使微生物细胞更容易获取烃。

表面活性剂的存在, 对于表面活性剂产生菌降解烃, 一度被认为是必须的。Koch 等通过一个铜绿假单胞菌降解十六烷的实验来证明鼠李糖脂在烷烃摄入过程中的重要性。菌株 PG201 的突变株 65E12 不能产鼠李糖脂, 而且也失去了摄入 $C_{12} \sim C_{19}$ 烷烃生长的能力。但是当把纯化的鼠李糖脂添加到培养基中后, 65E12 摄入十六烷和利用烷烃生长的能力又恢复了。Ochsner 等对 65E12 的突变基因进行了分析, 发现该菌株编码转录激活蛋白的 *rhIR* 基因发生了单一的碱基缺失。而在 Beal 和 Betts 的研究中采用的另一株鼠李糖脂缺失菌 UO299, 是由于其 *rhIA* 基因失效, 该基因编码的是鼠李糖脂转移

酶的一个亚基。与 65E12 不同的是, UO299 能够利用十六烷生长, 但是对十六烷的降解率只达到 PG201 的 69%, 该结果表明鼠李糖脂对十六烷的降解不是最重要的因素, 但是它能够促进该过程的进行^[6]。

2.2 细胞趋化性的影响 在自然界中, 微生物不能依赖上述传质强化手段获取烃, 而是通过自身的运动与烃接触。尤其是对于在常温下保持固态的长链烃或者多环芳烃, 微生物的这一运动特性更为重要。Marx 和 Aitken 等人对 *Pseudomonas putida* G7 对菲的趋化性进行了一系列研究。他们发现细菌的趋化运动能力提高了菲的降解率, 而失去趋化性或失去运动能力的突变株对菲的降解则慢得多^[7]。然而, 以前有关微生物对烃的摄取和烃降解菌生长模型, 很少考虑细胞趋化性的影响, 这显然是需要改进的。

2.3 细胞表面疏水性的调适 微生物在摄入烃的过程中, 细胞表面的疏水性必须得到调整以获得与这些水不溶性底物的良好接触, 以烃为碳源生长的细胞都在不同程度上显示出疏水性。同时细胞表面疏水程度的不同也将影响其在油-气-水多相体系中的分布状况。

在同一生长环境中生长的不同阶段, 微生物细胞表面特性是不断变化的。Harald 等观测到, 在以十六烷为底物的生长过程中, *Rhodococcus* sp. 在对数生长期显示出极大的疏水性, 而到稳定期疏水性显著下降^[8]。Norman 等发现 *Pseudomonas aeruginosa* 的细胞表面形貌及疏水性在以烃为碳源和以葡萄糖为碳源时表现出很大差异。结合原子力显微镜形貌分析和 SDS-PAGE 分析, 推测细胞在以烃为碳源生长时降低了 O-抗原的表达, 后者是脂多糖增长反应的推动者, 这样造成的结果是细胞表面的脂多糖糖环数减少, 因此疏水性增加, 进而增强了细菌对烃的摄取和降解^[9]。

Bouchez-Naitali 等报道, *Rhodococcus equi* 在以十六烷为碳源生长时, 表现出极大的疏水性, 导致细胞聚集现象的出现, 这种情况下细菌的生长曲线仅经历一个非常短暂的对数生长期; 而在强烈搅拌下, 细胞聚集得到有效控制, 从而得到了一个较长的对数生长期。这说明, 细胞表面疏水性强也会对细菌的生长产生一定的抑制作用^[10]。

2.4 表面活性剂对细胞表面特性的影响 人们已经认识到, 表面活性剂不仅对底物状态产生影响, 而且也对细胞表面性质产生影响, 在烃的摄取过程中, 后者的重要性同样不容忽视。

一种工业乳化剂 Corexit 9750 含有非离子和阴离子表面活性剂两类主要成份。Bruehm 等发现非离子部分, 如 Span80 等能够克服细胞表面的传输限制, 增强醋酸盐的摄取; 非离子部分 AOT 则抑制氧化系统。单纯添加 Span80 能够促进 *Acinetobacter calcoaceticus* 对烃的降解, 而添加 AOT 则相反。Corexit 9750 所起的作用似乎是两种效应的总和^[11]。

在 *Pseudomonas aeruginosa* 的培养物中添加鼠李糖脂, Zhang 和 Miller 发现细胞表面的疏水性增强。Al-Tahhan 等认为, 鼠李糖脂能将细胞表面的脂多糖萃取下来, 而使细胞表面更疏水, 进而改善了细胞与疏水性底物的接触状况, 使烃的摄取得到增强^[12]。

3 烃的跨膜(壁)输送

3.1 烃跨膜输送的位置 Kappeli 和 Fiechter 发现耐热假丝酵母在利用烃生长时在细胞壁上存在疏水性区域。因此人们推测烃和表面活性剂的复合物在该疏水区域分离, 使该区域的烃富集, 从而使烃能够强制向细胞内运输。

大量的实验现象表明, 烃降解微生物对表面活性剂具有选择性, 即不同的微生物往往需要不同的表面活性剂才能增进其烃的摄取, 这为上述假设提供了支持。Ratledge 解释说造成这种对生物表面活性剂的选择性接纳的原因, 可能是细胞表面存在特异性的双亲受体通道, 即在该位置烃和表面活性剂的复合物发生分离, 该受体通道的特异性导致某些表面活性剂与烃复合物能在该处分离, 而另一些则不行, 从而使人们观察到上述选择性。但是到底是细胞壁上哪个区域被用作烃的传输还没有被确定下来。

3.2 烃跨膜输送的能量需求 借助透射电镜, 人们对烃降解微生物的微观结构进行了观测。在几乎所有以烃为碳源的微生物细胞中都发现了内含体, 近一步的分析证实这是烃的聚集体。Noel 等观察到 *Acinetobacter* sp. 在以烃为碳源生长时, 在对数生长期有 40% 的细胞含有 4 个这样的内含体, 而到平衡期则近有 3% 含有 1 个内含体^[13]。

显然, 在细胞内富集如此高浓度的烃在热力学上是不稳定的, 因此人们推测烃的跨膜输送是一个需要能量的主动运输过程。通过对 *Mycobacterium* sp. 摄入菲的观察, Naoyuki 等发现对于未诱导 (用醋酸盐培养) 细胞, 细胞内菲浓度在极短时间内即达到平衡并维持在一个较低的水平上, 而这样一个短促的摄取过程不受主动运输抑制剂的影响。这说明, 菲通过被动扩散迅速进入细胞。而对诱导细胞 (用菲培养), 在几分钟内细胞持续不断地摄取菲, 并在高浓度下达到饱和, 该摄取过程受到抑制剂的严重阻碍, 说明细胞通过主动运输摄取菲^[14]。这与其它研究者的报道一致, 说明细胞摄取烃是需要能量的。

3.3 烃跨膜输送的选择性 烃降解微生物通常具有一个底物范围, 或是在对混合烃的降解过程中表现出某种偏好性。除了这些微生物拥有各异的代谢途径所造成的影响以外, 烃的跨膜传输也起到重要作用。Kim 等发现 *Rhodococcus erythropolis* 对十六烷的摄取和降解都比对十八烷的快得多, 而且在混和碳源中十六烷浓度下降时, 这种选择性更强。这说明细胞的主动运输系统能够有效区分两种同系物, 从而使烃的跨膜传输表现出选择性^[15]。

4 展望

人们对表面活性剂与疏水性物质的作用已经有了很明确的认识, 而且对表面活性剂在烃降解过程所表现出的影响也有一些宏观的了解。然而, 从上述讨论中我们看到表面活性剂对烃摄入过程的各阶段都有影响, 正是这种作用的多重性以及表面活性剂的多样性, 使其与培养体系中的固体表面、烃和细胞呈现出复杂的关系。因此在烃摄入过程中, 表面活性剂的确切作用方式还不明确, 甚至还有某些相互矛盾的推测和结论, 以致于人们还不能很好地预测人为添加表面活性剂对环境生物整治的影响。由此可见, 必须在明晰烃摄入过程各阶段的基础上, 设计有针对性的研究方法, 更全面和更深刻地理解表面活性剂与烃的微生物摄入过程的关系。

主动运输是庞大的烃分子甚至烃油滴跨膜运输的主要方式, 一些研究结果与细胞表面存在某种使烃-表面活性剂复合物发生分离的区域的假设吻合。然而, 具体的作用过程和作用位置还不明确。在该过程中所观察到的选择性输送, 也暗示烃跨膜输送是在一个精密的机制下运作的。在这些方面, 人们的认识还相当欠缺。可以预期, 在生物过程分离系统和生物感受器方面的应用潜力, 会成为烃跨膜传输机制研究的重要推动力。

参考文献

- [1] Manjeet S, Jitendra D. *J Sci Ind Res*, 1986, **45** (9): 413 ~ 417.
- [2] Hommel R K, Ratledge C. *Biosurfactants: Production Properties and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc, 1993.
- [3] Bouchez N M, Rakatozafy H, Marchal R, *et al.* *J Appl Microbiol*, 1999, **86** (3): 421 ~ 428.
- [4] Hori K, Matsuzaki Y, Tanji Y, *et al.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **59**: 574 ~ 579.
- [5] Leonardo S, Stefania M, Giorgio P P. *Bioresour Technol*, 1999, **67** (2): 191 ~ 199.
- [6] Beal R, Betts W B. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**: 158 ~ 168.
- [7] Marx R B, Aitken M D. *Environmental Scientific Technology*, 2000, **34**: 3379 ~ 3383.
- [8] Bredholt H, Bruheim P, Potocky M, *et al.* *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, **48** (4): 295 ~ 304.
- [9] Norman R S, Frontera-Suau R, Morris P. *J Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68** (10): 5096 ~ 5103.
- [10] Bouchez-Naitiali M, Blanchet D, Veronique B, *et al.* *Microbiology*, 2001, **147**: 2537 ~ 2543.
- [11] Bruheim P, Bredholt H, Eimhjellen K. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (4): 1658 ~ 1661.
- [12] Al-Tahhan R A, Sandrin T R, Bodour A A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3262 ~ 3268.
- [13] Noel K R, Sullivan E R. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology General Meeting, 2003.
- [14] Miyata N, Iwahori K, Foght J M, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70** (1): 363 ~ 367.
- [15] Kim I S, Foght J M, Gray M R. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **80** (6): 660 ~ 669.