

研究报告

铜绿假单胞菌对长链烷烃的摄取模式*

刘 晔 傅 涛 牟伯中** 刘洪来

(华东理工大学化学与制药学院 上海 200237)

摘要: 研究了一株铜绿假单胞菌 (CGMCC 1.1785) 摄取长链烷烃的模式。铜绿假单胞菌 1.1785 能够以固态的长链烷烃为唯一碳源生长, 在培养过程中产生表面活性代谢物。烃与水相的界面面积是细菌生长重要的影响因素, 说明传质限制的存在。由于该菌不能够利用鼠李糖脂增溶的烃作为碳源, 因此添加鼠李糖脂能够强化烃摄取的主要原因是烃界面的扩大。细胞表面疏水性从开始的急剧升高到后来的不断下降, 说明在不同生长阶段细胞对烃的摄取模式是不同的。由此认为, 铜绿假单胞菌 1.1785 既没有通过表面活性剂介导模式获取烃, 也并非完全通过直接接触模式获取烃。据此提出该菌采用了一种运动接触的烃摄取模式, 其趋化运动能力在这种摄取过程中起到重要作用。

关键词: 铜绿假单胞菌, 长链烃, 摄取, 鼠李糖脂, 细胞表面疏水性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0001-06

Mode of Long-chain Alkane Uptake by a *Pseudomonas aeruginosa**

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

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

Abstract: The mode of long-chain alkane uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (CGMCC 1.1785) was studied. *P. aeruginosa* 1.1785 is capable of using solid long-chain alkane as sole carbon source and producing surface active compound as metabolite. The mass transfer limitation in uptake of alkane was confirmed from the observation that interfacial area of eicosane with water dominates the growth rate of this strain. The enhancement of eicosane uptake by rhamnolipid was mainly caused by increase of interfacial area, since the pseudosolubilized alkane can not support the growth of *P. aeruginosa* 1.1785. Cell surface hydrophobicity was increased dramatically at the initial phase of growth and followed by a gradual decrease, which indicates that different modes are employed by *P. aeruginosa* 1.1785 at different growth phase. Therefore, the surfactant mediated mode can be negligible in the uptake process, while the directly attachment mode may not work throughout the growth of *P. aeruginosa* 1.1785. We proposed a novel uptake mode, in which the chemotaxis of this strain plays an important role.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Alkane, Uptake, Rhamnolipid, Hydrophobicity of cell surface

自然界中广泛存在能够降解烃类化合物的微生物, 出于环境整治和石油开采方面的考虑, 人们对微生物摄取烃类化合物的机制投以持续的关注, 希望从中找到提高烃

* 国家自然科学基金 (No. 50374038)

高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20030251002)

上海市科委资助项目 (No. 045407017)

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

收稿日期: 2004-07-16, 修回日期: 2004-11-03

降解效能的方法。长链烃是一种疏水性底物,在水中的溶解度极低,目前人们认为微生物摄取烃主要采取表面活性剂介导模式和界面接触模式^[1]。铜绿假单胞菌是常见的烃降解细菌,许多菌株能够产生鼠李糖脂,可有效降低油水界面张力,使烃乳化甚至增溶。因此,通常认为铜绿假单胞菌可采用表面活性剂介导的模式摄取烃^[1]。近年来,鼠李糖脂对铜绿假单胞菌摄取烃的必要性以及它对底物状态和细胞表面特性的影响都受到关注^[2-4]。然而,目前对铜绿假单胞菌摄取烃的机制以及它代谢产生的鼠李糖脂在摄取过程中所起的作用还没有一个清晰的认识。我们对细胞表面疏水性的变化过程进行了监测,同时通过控制疏水性碳源面积的方法考察了该菌利用增溶烃生长的可能性,在铜绿假单胞菌摄烃模式方面获得了新结果。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) CGMCC 1.1785 选自中国微生物保藏中心,该菌可降解 C_{16} 到 C_{30} 的长链烷烃,而且能够产生表面活性物质。二十烷和十六烷购自 Aldrich Chemical Company, Inc. (USA), 纯度大于 99%。鼠李糖脂为 R1 和 R2 型混合物,购自 Jeneil Biosurfactant Co., LLC (USA), 纯度大于 97.5%。

1.2 细菌培养

采用基本盐培养基组成为 K_2HPO_4 10g/L, NaH_2PO_4 5g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2g/L, $MgSO_4$ 0.2g/L, $CaCl_2$ 2~3mg/L, $FeSO_4$ 1~2mg/L, 酵母粉 100mg/L, 0.1% 二十烷作为碳源。固定面积蜡片以直径 8mm 滤纸片反复浸入融化的二十烷,室温冷却后制得,每个培养瓶中投加 4 片。30℃ 下三角摇瓶培养,转速 120r/min。

1.3 生长测定

采用改进的吸光度法测定菌浓,具体为:取 3mL 发酵液,加入 Triton X-100 使最终浓度达 0.2%,漩涡混和 30s 后以 10,000g 离心 10min,移除含油的上清液后加入 3mL 盐培养基振荡重悬,以该程序洗涤细胞 3 次,以盐培养基定容 3mL 并重悬,测定 OD_{600} 值。实验测定结果以 2 次平行测定为准。

1.4 细胞表面疏水性测定

细胞表面疏水性采用 BATH (bacteria adhesion to hexadecane) 测定方法^[5]。具体为,取 2mL 菌液(必要时稀释使 OD 值在 0.1~0.2 之间)注入 10mm × 150mm 玻璃管中,在样品玻璃管中注入 0.1mL 十六烷,置于 30℃ 下温育 10min。在漩涡振荡器上振荡 1min 后静置 30s,再振荡 1min 后将样品置于 30℃ 下静置 1h。以注射器吸取下层菌液,注入比色皿中测定 OD_{600} 值。同期测定未经十六烷吸附的菌液菌浓,两者比值为细胞表面疏水性参数。测定结果以 3 次测定平均值为准。

1.5 界面张力测定

除菌培养液采用 Tensiometer TX-550A 全程界面张力测定仪 (Bowling Industry Co., USA) 测定对十六烷的界面张力。测定结果以 3 次测定平均值为准。

2 结果与讨论

2.1 界面面积对生长的影响

为考察界面面积对生长的影响,采用经超声波分散和未分散两种形式的底物培养

铜绿假单胞菌 1.1785，细菌的生长曲线如图 1 所示。

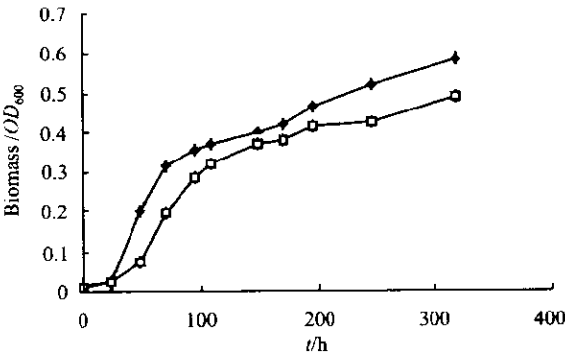


图 1 铜绿假单胞菌利用分散和未分散的二十烷生长
◆ 表示二十烷经超声波分散，□ 表示二十烷未经处理

从图 1 可知，二十烷在经超声波分散后，1.1785 的生长速度显著上升。从两条生长曲线中都可看到，1.1785 利用二十烷的生长曲线具有以下特点：其一，存在明显的延迟期，说明烃氧化系统的表达是受到底物诱导而启动的；其二，存在短暂的指数生长期，更确切的说是快速生长期（由于细胞扩增的指数性不显著）；其三，存在长时间的缓慢生长期，这个线性生长期（linear phase）在细菌利用疏水性底物时常常能够观察到^[6]。这些现象都说明疏水性底物的传质限制制约了细菌的生长。

2.2 鼠李糖脂对生长的影响

鼠李糖脂是铜绿假单胞菌在生长过程中代谢产生的生物表面活性剂，很多研究者都报道鼠李糖脂对细菌降解烃表现出增强效应，然而对这种效应的产生原因却有不同解释^[7]。在培养基中添加不同浓度的鼠李糖脂，生长曲线如图 2 所示。

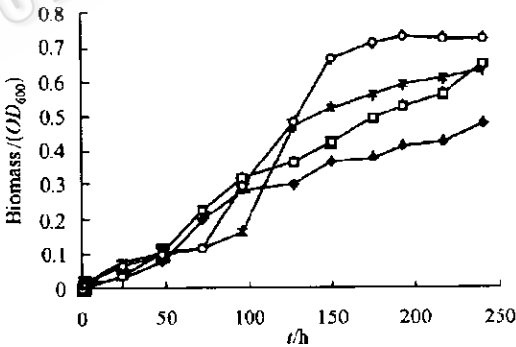


图 2 鼠李糖脂对铜绿假单胞菌生长的影响
鼠李糖脂浓度：◆ 0mg/L，□ 114.5mg/L，× 280mg/L，○ 562.5mg/L

与相关报道一致的是，鼠李糖脂的加入有效提高了 1.1785 的生长速率，而且鼠李糖脂浓度越高这种增强效果就越显著。同时，还有现象值得关注。首先，随着培养液中鼠李糖脂浓度的升高，1.1785 生长过程中的延迟期延长，也就是说鼠李糖脂在该阶段抑制了该菌的生长。其次，虽然在高鼠李糖脂浓度下，快速生长期的到来被推迟，但是细胞在该阶段的快速扩增却更显著。

Chakravarty 等认为铜绿假单胞菌在摄烃过程中, 不断产生鼠李糖脂。而这种天然表面活性剂可使更多的烃处于“可接纳”状态(包括乳化增溶等), 从而反过来又促进了烃的摄取。据此他建立了一个数学模型来描述表面活性剂产生菌对烃的摄取机制^[6]。而 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^[8]。然而, 这些推测不能完全解释以下两个疑点: 其一, 鼠李糖脂为何在延迟期抑制了细菌的生长; 其二, 细胞在快速生长期的扩增是否得益于“增溶烃”。要解释以上疑问, 必须对烃的摄取模式有明确的判断。

2.3 细胞表面疏水性的变化

为了与疏水性底物获得良好接触, 细胞表面必须具有疏水性区域或表现出一定的疏水性。细胞表面疏水程度的高低是判断微生物摄取烃模式的重要依据^[1]。为此对 1.1785 在生长过程中的细胞表面疏水性进行了监测, 细胞表面疏水性参数与生长的关系如图 3。

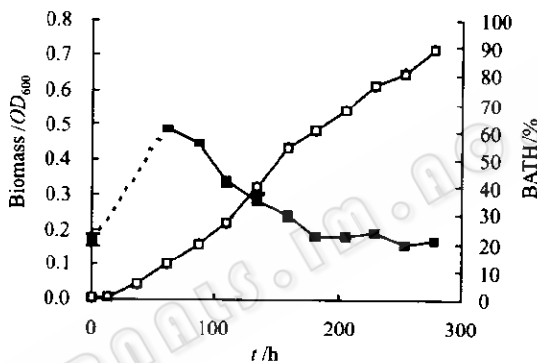


图3 铜绿假单胞菌生长过程中 BATH 值的变化

□ 细胞浓度, ■ 细胞表面疏水性

如图 3 所示, 细胞表面疏水性在刚接种时很低。但在生长的延迟期, 细胞表面疏水性快速的上升, 最高有 60% 的细胞倾向于富集于烃水界面; 随后表面疏水性开始逐渐下降, 在缓慢生长期恢复到刚接种时的 20% 左右。这暗示, 细胞在不同的生长阶段可能采取不同的摄取模式获取烃。在一些相关报道中, 也能看到细胞表面疏水性在指数生长期很高, 而后又逐步降低的现象^[9]。

2.4 培养液界面张力的变化

为了判断铜绿假单胞菌 1.1785 对长链烷烃的摄取模式, 对其培养液与十六烷的界面张力进行了监测, 结果如图 4。

从图 4A 可知, 培养液的界面张力在开始有明显下降, 随后是长时间的缓慢下降, 然而从总体上看界面张力值的变化并不大。图 4B 显示在培养基中添加鼠李糖脂, 水相与十六烷的界面张力值。显然, 鼠李糖脂能有效降低界面张力, 即使是很低浓度也可使界面张力大幅降低。由于培养液中表面活性物质的浓度不高, 我们还没有从结构上确定铜绿假单胞菌 1.1785 所产表面活性物质是否就是鼠李糖脂。但是就该实验结果而言, 该菌不能产生大量的表面活性物质。

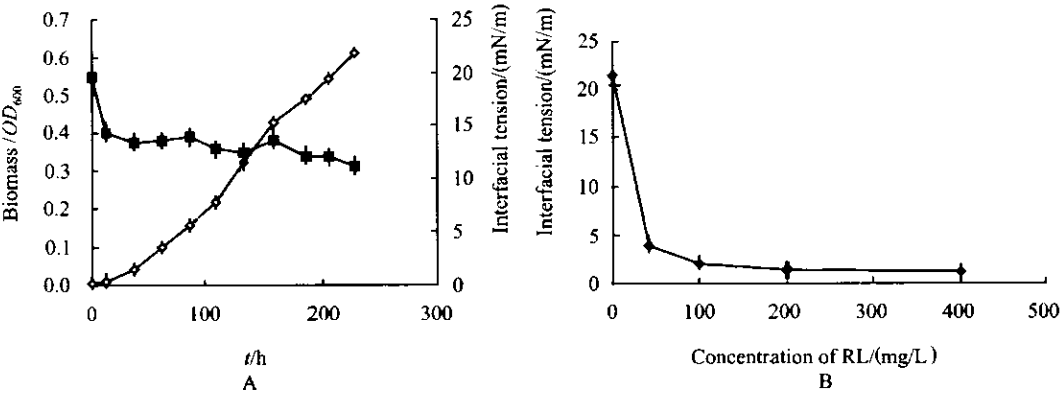


图 4 生和表面活性剂对界面张力的降低效果

A 生长过程中培养液界面张力的变化, \diamond 细胞浓度, \blacksquare 界面张力; B 含鼠李糖脂培养液的界面张力

2.5 细胞对增溶烃的摄取

根据预实验结果分析, 采用固定面积的二十烷蜡片作碳源, 可有效控制烃水界面面积的差异的影响。据此设计固定界面试验以直观了解鼠李糖脂对烃摄取的影响, 结果如图 5。在该实验条件下, 培养体系中仅存在两种状态的烃: 其一是保持原始状态的固态烃, 与水相存在明显的界面; 其二是被鼠李糖脂增溶的烃, 在超过鼠李糖脂 CMC 点的浓度下会存在。

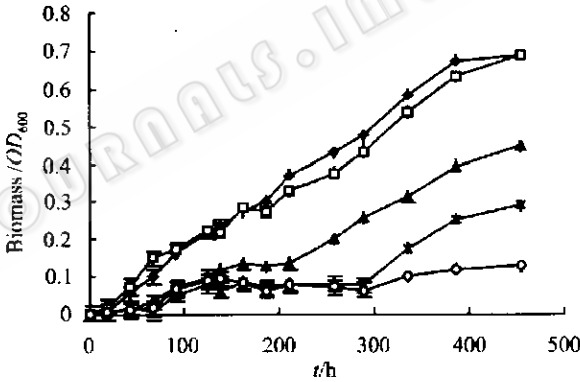


图 5 铜绿假单胞菌 1.1785 以固定面积二十烷生长曲线

添加鼠李糖脂浓度: \blacklozenge 0mg/L, \square 40mg/L, \blacktriangle 100mg/L, \times 200mg/L, \circ 400mg/L

图 5 表明, 当不添加鼠李糖脂或添加量小于其 CMC 浓度 (实验测定该鼠李糖脂样品 CMC 值为 75mg/L) 时, 1.1785 总体上生长较为快速。而在高浓度的鼠李糖脂下延迟期延长的现象再次出现, 而且总体上看高浓度的鼠李糖脂没有令生长加速。尤其值得注意的是, 鼠李糖脂浓度高时, 增溶烃的含量也较高, 然而没有发现细胞更快的扩增。这说明, 细胞并没有摄取增溶烃作为碳源。

2.6 烃的摄取机制

根据细胞表面疏水性和培养液界面张力都较高, 可以推断 1.1785 在生长的初期是采用界面接触模式获取烃的。如果该推测成立, 那么就能解释为什么鼠李糖脂延长了延迟期。因为表面活性剂有聚集到烃水界面的倾向性, 这就与试图吸附在界面的细胞

产生了竞争,高浓度的鼠李糖脂使细胞与烃获得良好接触的几率降低了。推而广之,胞外的生物表面活性剂对于微生物来说是次生代谢产物,需要到达较高的细胞浓度时才会大量产生。那么可以推测,即使是能够大量产生胞外表面活性剂的烃降解微生物在生长初期也将采用界面接触模式摄取烃。

由于铜绿假单胞菌 1.1785 不能利用增溶烃,即并未采用表面活性剂介导模式;而细胞又大量游离于水相中,在生长后期表现出较低的表面疏水性,这与界面接触模式也有所不符。应该指出,许多研究者将微生物对烃的摄取过程视为一个普通的化学反应过程,主要考虑的是烃的传递及其与细胞的接触,但是微生物所具有的化学趋向性和运动能力却被忽视。近来,细菌趋化运动能力对摄取疏水性底物的重要意义得到确认^[10]。据此,我们推测细胞采取了“趋向性运动-界面接触-脱离”的过程摄取烃。在这种情况下,界面上的细胞将不断更替,有限的烃水界面面积就能够维持更多的细胞生长。比起富集在油水界面或其周围的分支杆菌来说,这种机制将更有效率。

然而,目前我们还没有直接的证据证实这种运动接触摄取模式,而且对于各生长阶段的限制性因素还缺乏定量的描述,对于构建一个完整的认识而言,这都是需要进一步开展的工作。

3 结论

(1) 铜绿假单胞菌 1.1785 在以长链烷烃为唯一碳源生长的过程中,最初阶段采用界面接触模式获取烃。显然,这种现象应在许多能够产生胞外生物表面活性剂的微生物中都存在。

(2) 铜绿假单胞菌 1.1785 不能摄取并利用被鼠李糖脂增溶的烷烃,即表面活性剂介导的烃传递过程是失效的。

(3) 根据实验事实推断,铜绿假单胞菌 1.1785 采取了一种运动接触方式摄取烃,对个体细胞来说存在“趋向性运动-界面接触-脱离”的过程。从宏观上看,烃水界面上的细胞是不断更替的,而水相中的细胞也将均匀分布。这种烃的摄取机制比静止的界面接触机制有更高的传质效率。

参考文献

- [1] Bouchez N M, Rakatozafy H, Marchal R, *et al.* J Appl Microbiol, 1999, **86** (3): 421 ~ 428.
- [2] Beal R, Betts W B. Journal of Applied Microbiology, 2000, **89**: 158 ~ 168.
- [3] Wouter H N, Johann H J, Geert J B, *et al.* Journal of Biotechnology, 2002, **94**: 195 ~ 212.
- [4] Prabhu Y, Phale P S. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, **61**: 342 ~ 351.
- [5] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. FEMS Microbiology Letters, 1980, **9**: 29 ~ 33.
- [6] Chakravarty M, Singh H D, Baruah J N. Biotechnology and Bioengineering, 1975, **17**: 399 ~ 412.
- [7] 钱欣平, 阳永荣, 孟 琴. 微生物学通报, 2002, **29** (3): 75 ~ 78.
- [8] Al-Tahhan R A, Sandrin T R, Bodour A A, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 3262 ~ 3268.
- [9] Bredholt H, Bruheim P, Potocky M, *et al.* Canadian Journal of Microbiology, 2002, **48** (4): 295 ~ 304.
- [10] Marx R B, Aitken M D. Environmental Scientific Technology, 2000, **34**: 3379 ~ 3383.