

不同基质条件下透性处理对脱硫弧菌硫酸盐还原活性的影响

徐慧纬^{1,2} 张旭¹ 李立明¹ 郑光洁¹ 李广贺^{1*}

(1. 清华大学环境学院 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084; 2. 住房和城乡建设部城乡规划管理中心, 北京 100835)

摘要: 乙醇透性处理 1 株普通脱硫弧菌 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) 强化硫酸盐生物还原活性, 研究不同基质条件下透性处理程度对其硫酸盐还原活性影响. 当以 H₂ 为电子供体时, 10% 乙醇处理的 DvH 硫酸盐还原活性最强, 其次为 15%; 当乙醇浓度 > 15% 时, DvH 硫酸盐还原活性显著降低. 当以乳酸为电子供体时, 最佳乙醇浓度为 20%, 其次为 15% 和 10%. 乙醇浓度达到 25% 时, DvH 仍保持一定的还原活性. 不同供体条件下 DvH 对透性处理程度的响应不同, 是因为 H₂ 与乳酸在细胞内发生氧化的位置不同, 从而胞内电子传递途径不同. 确保供体与受体之间电子传递链的完整性是合理确定透性处理程度及透性技术应用的关键.

关键词: 脱硫弧菌; 透性处理; 硫酸盐还原; H₂; 乳酸

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)01-0177-05

Effect of Permeabilization on Sulfate Reduction Activity of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Cells in the Presence of Different Electron Donors

XU Hui-wei^{1,2}, ZHANG Xu¹, LI Li-ming¹, ZHENG Guang-jie¹, LI Guang-he¹

(1. State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Urban-Rural Planning Administration Center of Ministry of Housing and Urban-Rural Development, Beijing 100835, China)

Abstract: The *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) cells permeabilized with ethanol were used as biocatalysts to enhance hydrogenotrophic sulfate conversion. The effect of permeabilization extent of DvH cells on sulfate reduction was studied in the presence of different electron donors. When hydrogen was used as an electron donor, the highest level of sulfate reduction activity attained in cells treated with 10% ethanol (V/V), followed by 15% ethanol treated cells. Furthermore, sulfate reduction activity markedly decreased when the ethanol concentration exceeded 15%. However, when lactate was used as the electron donor, the optimum ethanol concentration of the permeabilizing reagent was 20%, followed by 15% and 10%. Even when ethanol concentration reached 25%, DvH cells remained their partial activity with lactate. In a word, sulfate reduction activity of DvH cells responded differently in the presence of different donors. This was because the oxidation process of H₂ and lactate occurred at different positions in DvH cells, and consequently intracellular electron transport pathway differed. To ensure the integrity of the electron transport chain between the donor and the acceptor was a key factor for determining the permeabilization extent and for the application of cell permeabilization technology.

Key words: *Desulfovibrio vulgaris*; permeabilization; sulfate reduction; H₂; lactate

细胞透性处理技术能够在不破坏细胞整体体系的情况下, 适当增强细胞壁膜的通透性, 降低传质阻力, 提高生物催化效率. 透性处理过程简便, 方法多样, 已成为生物转化、胞内物质提取、胞内酶原位分析、固定化细胞制备等领域的有效技术手段^[1-3]. 近年来水处理领域也开始应用多结合细胞固定技术^[4-6]. 硫酸盐还原菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 是革兰氏阴性菌 (G⁻), 细胞壁可分为外膜和内膜两层, 脂类在整个细胞壁中占有的比例很高, 可达 40% 以上. 研究表明, 利用有机溶剂适度增强其通透性可以显著提高硫酸盐还原速率^[7]. 然而, 细胞壁膜通透性改变情况与透性处理方法、剂量以及微生物

类型密切相关. 即使采用相同透性处理方法, 同一类微生物、甚至同一微生物的不同生长阶段, 也会由于细胞壁、膜的组成和结构不同而有很大差别, 这增加了透性处理技术应用的不确定性. 目前, 对于硫酸盐还原菌透性处理及应用的研究较少, 为此本研究针对 SRB 外膜特性, 以 1 株普通脱硫弧菌 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) 为代表菌株, 采用乙醇

收稿日期: 2012-03-24; 修订日期: 2012-05-15

基金项目: 环境保护公益性行业科研专项重大项目 (201009009-003)

作者简介: 徐慧纬 (1981 ~), 女, 博士, 主要研究方向为水体污染控制与修复, E-mail: huiweixu@163.com

* 通讯联系人, E-mail: ligh@tsinghua.edu.cn

为有机透性剂进行处理,比较分析分别采用 H_2 和乳酸为电子供体条件下,透性处理程度对 DvH 硫酸盐还原活性的影响,并探讨了作用机制,以期为此项技术的应用提供支撑。

1 材料与方法

脱硫弧菌是 SRB 的典型菌属,能够利用 H_2 作为无机电子供体,也能利用有机物(如乳酸)为电子供体。研究选用脱硫弧菌的代表菌种 DvH (DSM644),购自德国微生物保藏和细胞培养中心(DSMZ),培养基采用 Medium 63^[8]。

透性处理步骤:将 1 500 mL 30℃ 培养 72 h 的菌液在 9 000 $r \cdot \min^{-1}$ 4℃ 下离心 15 min (日立 CR22G, 日本),收集菌体,用 80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐-2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2S 缓冲液(PsBS, pH 7.0)离心洗涤两次,用 50 mL PsBS 重新悬浮。取 5 mL 菌悬液分别加入 50 mL 不同乙醇浓度的透性试剂中摇匀,4℃ 下静置接触 30 min,离心洗涤后重新悬浮于适量 PsBS 即得透性处理的细菌。透性试剂为 PsBS 添加乙醇制得,乙醇浓度为 0% ~ 40% (体积浓度),通过调节透性剂中的乙醇浓度来控制透性处理程度。不含乙醇的 PsBS (即 0% 乙醇)同步处理的细菌为对照,所有操作在无菌厌氧环境下进行。

硫酸盐代谢活性检测:反应瓶体积 500 mL,培养基 350 mL,反应瓶置于 30℃ 恒温摇床,振荡速度 100 $r \cdot \min^{-1}$ 。活性测试基础培养基每升含有如下组分: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.15 g, KH_2PO_4 0.54 g, NH_4Cl 1.0 g, MgSO_4 0.06 g, Na_2SO_4 1.42 g, 混合维生素及微量元素 2 mL, NaHCO_3 0.168 g, Na_2S 2.4 mmol。当用 H_2 为电子供体时,基础培养基中添加 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAC 与 HCO_3^- 共同作为同化碳源(DvH 以 H_2 为电子供体代谢时,不能以无机碳为单一碳源^[9-11]),并添加 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生物素(维生素 H, 过滤除菌)促进菌体生长,上方气室充满 $H_2/\text{CO}_2 = 9/1$ 的混合气(微正压)。其中 NaHCO_3 及 Na_2S 分别配制 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、240 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高浓度储备液,独立灭菌冷却后在厌氧环境下加入,必要时用 HCl 调节 pH 至 7.5。当用乳酸做电子供体时,添加乳酸钠 4.7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,不加 NaHCO_3 和 NaAC ,气室充满高纯 N_2 。硫酸盐浓度采用比浊法^[12]测定。

2 结果与分析

2.1 以 H_2 为电子供体的 SO_4^{2-} 还原

不同浓度乙醇处理的 DvH 在以 H_2 为电子供

体、可增殖条件下的硫酸盐浓度变化曲线如图 1 所示。

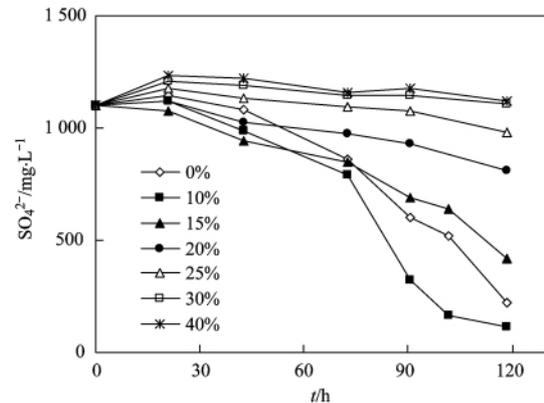


图 1 以氢气为电子供体时硫酸盐浓度变化曲线
Fig. 1 Profiles of sulfate concentration variation with H_2 as an electron donor

由图 1 可见,对照细菌和低浓度乙醇(10% ~ 15%)处理的 DvH 硫酸盐还原速率逐步提高(斜率绝对值逐渐增大)。透性处理增强 DvH 硫酸盐还原速率,这与细胞壁膜通透性增强后胞内 H_2 浓度提高,氢化酶可接触的有效基质浓度增大有关^[13],本课题组之前的研究结果也表明,适度透性处理后氢化酶活性显著提高^[7]。结合透性细菌增殖能力的检测结果^[7],可以解释这一现象:当乙醇浓度 < 15% 时, DvH 细菌具有增殖能力,随着生物量逐渐增大,还原速率逐步提高。然而上述 3 种细菌的硫酸盐还原速率在不同时间段内变化规律不同, 0 ~ 42.5 h 期间,与对照细菌相比,10% 和 15% 乙醇处理的细菌的硫酸盐还原速率(斜率)较大,这是由于此阶段 DvH 增殖较少,透性处理增大 H_2 胞内浓度和氢化酶活性这一因素的影响占主要地位。而 72.5 h 之后,对照细菌的硫酸盐还原速率超过 15% 乙醇处理的细菌,但仍低于 10% 乙醇处理的细菌。这说明 72.5 h 之后,由于对照细菌和 10% 乙醇处理细菌的增殖加速,细菌增殖成为提升硫酸盐还原速率的主导因素。上述因素综合作用的结果表明,10% 乙醇处理的细菌由于兼具细胞通透性增强和增殖能力有效保持两个因素,其还原速率在整个间歇运行阶段最大。115.5 h 后其还原速率减缓,是由于 SO_4^{2-} 浓度变低所致。

与低浓度乙醇处理不同,当乙醇浓度为 20% 和 25% 时, DvH 硫酸盐还原速率较低,且反应速率(斜率)变化幅度不大。当乙醇浓度增大到 30% ~ 40% 时,几乎未检测到发生硫酸盐还原过程,此时细胞质流失严重,氢化酶活性丧失^[7]。

2.2 以乳酸为电子供体的 SO_4^{2-} 还原

当以乳酸为电子供体时,透性处理程度对 DvH 硫酸盐还原活性的影响见图 2. 从中可知,当乙醇浓度为 20% 时, DvH 的硫酸盐还原活性最大,其次为 10% 和 15% 乙醇处理的细菌. 比较分析 10% 和 20% 乙醇处理 DvH 的代谢活性,与以 H_2 为电子供体的情况显著不同: 一方面,具有增殖能力的 10% 乙醇处理的细菌的硫酸盐浓度变化曲线未出现斜率绝对值增大的情况,这可能是由于某种原因导致细菌增殖较慢或者菌体浓度低,使得增殖效应未得到体现; 另一方面,基本丧失增殖能力^[7]的 20% 乙醇处理的 DvH,在 20 ~ 83.5 h 期间始终维持较高的还原速率,平均为 $11.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. 当乙醇浓度提高到 25% 时,尽管 DvH 完全失去增殖能力,其仍具有一定的硫酸盐代谢活性. 上述现象从氢化酶活性和细菌增殖能力变化两个方面无法充分解释.

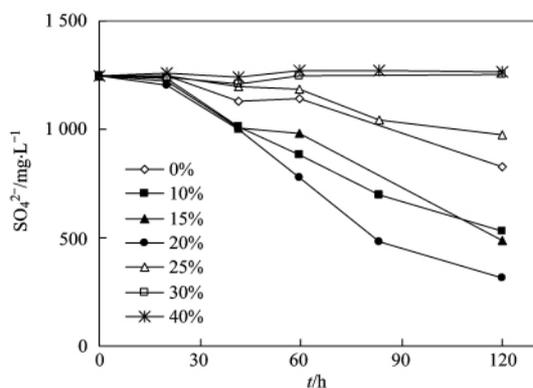


图 2 以乳酸为电子供体时硫酸盐浓度变化曲线

Fig. 2 Profiles of sulfate concentration variation with lactate as an electron donor

3 讨论

硫酸盐在 SRB 生物体内的还原需要转移 8 个电子,其代谢是多种酶参与的一系列复杂过程. H_2 从能量角度而言是极佳的电子供体,乳酸是研究 SRB 最“经典”的电子供体,可用于培养几乎所有的 SRB,且以乳酸为电子供体培养的脱硫弧菌转为以 H_2 为电子供体培养时几乎不存在延滞期^[14]. 同时, H_2 和乳酸是研究硫酸盐还原菌以无机和有机电子供体生长的两种典型电子供体,因而选用这两种电子供体进行比较研究具有很强的针对性和代表性.

SRB 以 SO_4^{2-} 为电子受体的代谢过程中, SO_4^{2-} 的还原发生在细胞质内^[15],即对于完整细胞而言, SO_4^{2-} 需要穿过细胞壁膜进入细胞质才能实现还原,透性处理强化细胞壁膜通透性,促进了 SO_4^{2-} 由胞

外到胞内的传质. 尽管由于两组实验采用的初始细菌浓度可能不同,无法从还原速率的绝对值进行比较,但由 2.1 和 2.2 节的结果可知,在不同的电子供体条件下,透性处理程度对于 DvH 的硫酸盐还原活性的响应差别很大: 当以 H_2 为电子供体时,乙醇浓度超过 15% 即对代谢过程产生较大负面影响; 而当以乳酸为电子供体时,透性剂中乙醇的最高允许浓度却较高,表现为 20% 乙醇处理的 DvH 代谢速率最快,25% 乙醇处理的 DvH 仍具有一定的还原能力. 分析不同基质条件下电子传递链可以解释这一区别.

脱硫弧菌以 H_2 / 乳酸为电子供体时电子传递过程如图 3 所示. 全序列 DvH 共有 6 种氢化酶^[16], 4 种位于细胞周质,一般认为这 4 种氢化酶参与完成 H_2 的氧化^[17,18]. 当以 H_2 为唯一电子供体时, H_2 在细胞周质空间被氧化^[14],释放质子,形成跨膜的质子梯度. 电子通过细胞色素 C_3 (TpI-C_3) 传递到细胞内部,经过一系列复杂的过程实现硫酸盐还原(图 3 中实线所示路径).

当脱硫弧菌以乳酸等有机物作为电子供体时,存在两种电子传递过程,且 2 种过程可同时作用. 第一种是乳酸氧化产生的还原力通过位于细胞质内的 $[\text{NiFeSe}]$ 氢化酶产生 H_2 并释放到细胞周质区^[19],在细胞周质区内, H_2 消耗过程与以 H_2 为唯一电子供体的过程相同(图 3 路径①). 第二种是在细胞质内一系列酶的作用下,电子从供体(乳酸)一步步传递到受体(SO_4^{2-}),无 H_2 参与环节,即电子传递链完全位于细胞质内(图 3 路径②). 动力学和热力学条件协同控制电子流在这两种途径流经的比例^[20],但研究证明产生 H_2 的环节不是必需的, Odom 等^[21] 构建了 1 株普通脱硫弧菌的突变菌株,能以乳酸/ SO_4^{2-} 生长,但不能利用 H_2 做电子供体,证明 H_2 的产生不是必需环节. 普通脱硫弧菌具备上述两种代谢途径是在进化过程中,为了适用环境条件改变以便于迅速做出响应而形成的^[14].

经过乙醇透性处理, DvH 细胞壁膜受到不同程度的损伤. 在以 H_2 为电子供体条件下,乙醇浓度 10% ~ 15% 时,细胞壁外膜通透性增强,细胞膜仍保持完整,周质空间氢化酶完成 H_2 的氧化过程,同时将电子传递给膜内相关酶完成硫酸盐的还原过程. 当乙醇浓度高于 15% 时,细胞壁破坏严重,周质空间的氢化酶流失,甚至细胞质流失,导致以 H_2 为唯一电子供体的电子传递链被打断, SO_4^{2-} 还原无法完成. 而当以乳酸为电子供体时,即使较高浓度乙醇

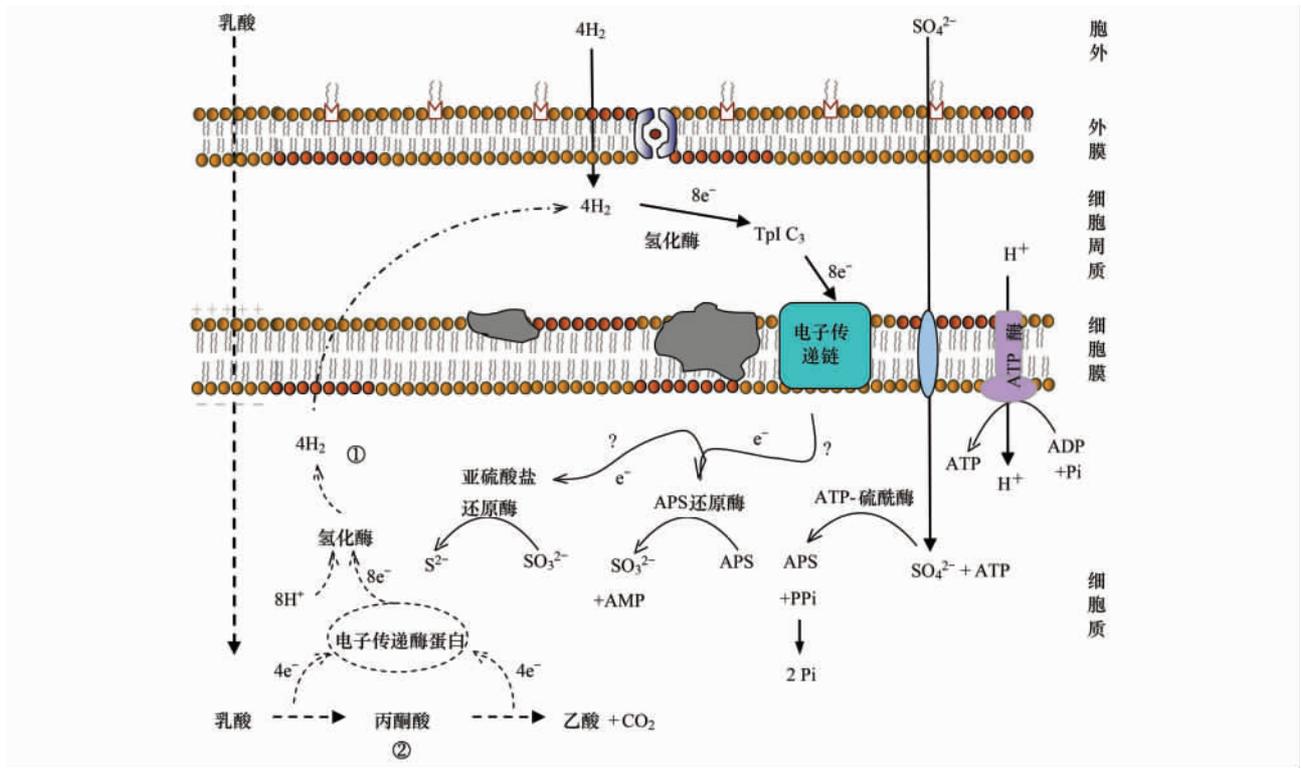


图3 脱硫弧菌以 H_2 /乳酸为电子供体时电子传递过程示意^[20-22]

Fig. 3 Schematic diagram of electron transfer process of *Desulfovibrio* with H_2 /lactate as an electron donor

破坏了细胞壁的完整性,菌体仍可以采用第二种代谢途径(图3路径②)完成由乳酸到 SO_4^{2-} 的电子传递,实现 SO_4^{2-} 还原,因而乙醇的最高允许浓度可达到25%。进一步提高乙醇浓度时,由于细胞膜被破坏,细胞质流失严重,无论采用哪一种电子供体,DvH的硫酸盐还原活性都基本丧失。

通过增强SRB细胞壁膜通透性促进硫酸盐还原是一种有效的手段。为避免透性处理技术应用的盲目性,应根据所采用的电子供体代谢特点,有针对性地确定透性处理程度,确保代谢过程电子传递链的完整性,否则代谢无法完成。

4 结论

(1) 乙醇透性处理普通脱硫弧菌DvH,可显著提高其硫酸盐还原速率。以 H_2 为电子供体时,10%乙醇处理的DvH代谢活性最强,乙醇浓度超过20%时DvH硫酸盐代谢活性损失较大;当以乳酸为电子供体时,最佳乙醇浓度为20%,乙醇浓度达到25%时DvH仍保持一定的硫酸盐还原活性。

(2) H_2 与乳酸在细胞内发生氧化的位置不同,决定了两种基质下,透性处理程度对DvH硫酸盐代谢活性的影响不同。确保供体与受体之间的电子传递链完整性是确定合理透性处理程度及透性技术应

用的关键。

参考文献:

- [1] 刘晓华,李海星,陈燕,等. 透性化细胞制备方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 475-479.
- [2] 王飏,田丰伟,励建荣,等. 冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(5): 684-688.
- [3] Kumari S, Panesar P S, Bera M B, et al. Permeabilization of yeast cells for β -Galactosidase activity using mixture of organic solvents: a response surface methodology approach [J]. Asian Journal of Biotechnology, 2011, 3(4): 406-414.
- [4] Choi K C, Song S H, Yoo Y J. Permeabilization of *Ochrobactrum anthropi* SY509 cells with organic solvents for whole cell biocatalyst [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2004, 9(4): 147-150.
- [5] Oh C K, Song S H, Kim Y H, et al. Bioelectrochemical denitrification using permeabilized *Ochrobactrum anthropi* SY509 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(5): 678-682.
- [6] Agthoven A V, Malergue F, Rabellino E. Cell permeabilization and stabilization reagent and method of use [P]. US 7678578, 2010-3-16.
- [7] Xu H W, Zhang X, Li L M, et al. Enhanced hydrogenotrophic sulfate reduction using *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cells permeabilized with ethanol [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84(10): 1539-1543.
- [8] http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium63.pdf, 2011-9-30.

- [9] Postgate J A. On the autotrophy of *Desulphovibrio desulphuricans* [J]. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 1960, **1**(1): 53–56.
- [10] Brandis A, Thauer R K. Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulphate as sole energy source [J]. *Journal of General Microbiology*, 1981, **126**(1): 249–252.
- [11] Brysch K, Schneider C, Fuchs G, et al. Lithoautotrophic growth of sulfate-reducing bacteria, and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. Nov. [J]. *Archives of Microbiology*, 1987, **148**(4): 264–274.
- [12] 美国公共卫生协会著, 宋仁元等, 译. 水和废水标准检验手册 [M]. (第 15 版). 北京: 中国建筑工业出版社, 1985. 404–415.
- [13] Caffrey S M, Park H S, Voordouw J K, et al. Function of periplasmic hydrogenases in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(17): 6159–6167.
- [14] Widdel F, Hansen T A. The dissimilatory sulfate and sulfur reducing bacteria [A]. In: Balows A, Truper H G, Dworkin M, et al (Eds.). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* [M]. New York: Springer-Verlag, 1992. 583–624.
- [15] Widdel F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria [A]. In: Zehnder A J B (Ed.). *Biology of anaerobic microorganisms* [M]. New York: John Wiley & Sons 1988. 469–585.
- [16] Heidelberg J F, Seshadri R, Haveman S A, et al, The genome sequence of the anaerobic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(5): 554–559.
- [17] Huynh B H, Czechowski M H, Kruger H J, et al. *Desulfovibrio vulgaris* hydrogenase: a nonheme iron enzyme lacking nickel that exhibits anomalous EPR and Mössbauer spectra [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, **81**(12): 3728–3732.
- [18] Rohde M, Fürstenau U, Mayer F, et al. Localization of membrane-associated (NiFe) and (NiFeSe) hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* using immunoelectron microscopic procedures [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, **191**(2): 389–396.
- [19] Odom J M, Peck H D. Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1981, **12**(1): 47–50.
- [20] Noguera D R, Brusseau G A, Rittmann B E, et al. A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental condition [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **59**(6): 732–746.
- [21] Odom J M, Wall J D. Properties of a hydrogen-inhibited mutant of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(1): 1335–1337.
- [22] Matias P M, Pereira I A C, Soares C M, et al. Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview [J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2005, **89**(3): 292–329.