

文章编号:1001-2443(2002)02-0181-04

嗜盐菌的研究进展

刘爱民

(安徽师范大学 生命科学学院,安徽 芜湖 24100)

摘要:嗜盐菌作为一种新型微生物资源,不仅为微生物生理、遗传和分类及生命科学和相关学科许多领域的研究提供新的课题,也为生物进化、生命起源的研究提供新的材料.本文主要讨论了嗜盐菌的嗜盐机理和应用方面的研究进展.

关键词:嗜盐菌;耐盐机制;应用

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A

嗜盐菌(*Halophiles*)指在高盐条件下生长的细菌,它主要生长在盐湖(中国的青海湖、美国大盐湖)、死海(黎巴嫩)、盐场等浓缩海水中,以及腌鱼、盐兽皮等盐制品上.根据其耐盐程度,可分为四类:即非嗜盐菌(最适生长盐度即氯化钠浓度 < 2%);弱嗜盐菌(最适生长盐度为 2% - 5%),多数海洋微生物属于这个类群;中等嗜盐菌(最适生长盐度为 5% - 20%)和极端嗜盐菌(最适生长盐度 > 15% - 30%),其中部分极端嗜盐菌为嗜盐古菌^[1-2].嗜盐菌多是好气化能异养类型,一些盐杆菌的种可进行厌氧呼吸^[3].细胞含类胡萝卜素,菌体呈红色、桃红、紫色,大多数不运动,只有少数种靠丛生鞭毛缓慢运动,采用二分分裂法进行繁殖,无休眠状态,不产生孢子.嗜盐菌种类繁多,它们的分类主要依据三个方面:表型特征、化学分类数据和分子生物学数据^[4].根据表型特征的不同,有嗜盐球菌和嗜盐杆菌.根据 16S rRNA 的序列分析并结合其它生物学形状,目前将极端嗜盐菌划分为 8 个属:盐杆菌属(*Halobacterium*)、盐深红菌属(*Halorubrum*)、*Halobaculum*)、富盐菌属(*Haloferax*)、盐盒菌属(*Haloarcula*)、盐球菌属(*Halococcus*)、嗜盐碱杆菌属(*Natronobacterium*)、嗜盐碱球菌属(*Natronococcus*)^[5].目前研究最多的是极端嗜盐菌中的盐生盐杆菌(*H. halobium*).

嗜盐菌作为一类新型的、极具应用前景的微生物资源,近年来受到人们的广泛关注,它们具有极为特殊的生理结构和代谢机制,同时还产生了许多具有特殊性质的生物活性物质^[6],对它的研究既具有理论意义,又有应用价值.在理论研究方面,人们对嗜盐菌的嗜盐机理尤感兴趣,生存在极端环境中的微生物,通常是通过代谢作用适应其所处生境而得以存活并发挥作用,集中表现在细胞膜、细胞壁结构性成分和功能性成分的稳定性、反应动力学、酶系的性质、代谢途径及信息传递、蛋白质核酸成分及构象等方面为了适应高盐环境而具有的特异性^[7-9],在应用方面引人注目是嗜盐菌紫膜和耐盐酶的开发利用.

1 嗜盐机理

对嗜盐菌的盐适应机理,目前有如下几种观点:^{[1][10]}

1.1 嗜盐菌的 Na⁺ 依存性

嗜盐菌要在高盐环境下生存,Na⁺对维持细胞膜、细胞壁构造和功能有特别重要的作用.

1.1.1 Na⁺与细胞膜成分发生特异作用而增强了膜的机械强度,有利于细胞膜结构的稳定.若把嗜盐菌的细胞放在蒸馏水中,便会立即发生溶菌,要维持细胞膜的构造,盐类的存在是必不可少的,尤其是 Na⁺的存在对阻止嗜盐菌的溶菌起着重要作用.

1.1.2 在细胞膜的功能方面,嗜盐菌中氨基酸和糖的能运系统内必需有 Na⁺存在,而且 Na⁺作为产能的呼吸反应中一个必需因子起着作用.实验证明,对于氨基酸的吸收是间接地通过光来驱动,一种氨基酸

收稿日期:2001-05-23

基金项目:安徽师范大学青年基金(125345)

作者简介:刘爱民(1968-),女,安徽太和人,讲师,硕士.

- Na^+ 泵运输系统用于运载氨基酸.

1.1.3 Na^+ 被束缚在嗜盐菌细胞壁的外表面,起着维持细胞完整性的重要作用.嗜盐杆菌的细胞壁以糖蛋白替代传统的肽聚糖,这种糖蛋白含有高量酸性的氨基酸,如天门冬氨酸和谷氨酸形成负电荷区域,吸引带正电荷的 Na^+ ,当维持细胞壁稳定性的 Na^+ 减少时,会导致细胞壁一块块地破裂,最后嗜盐菌的细胞被裂解.“过量”的酸性氨基酸残基在蛋白表面形成负电屏蔽,促进蛋白在高盐环境中的稳定.

1.2 嗜盐菌中酶的盐适应特性

高盐浓度可用于分离蛋白质,例如硫酸铵的分段沉淀、柱层析等.而嗜盐酶只有在高盐浓度下才具有活性,盐去除后,嗜盐酶失活.嗜盐酶在低盐浓度下(1.0mol/L 的 NaCl 和 KCl 条件下)大多数变性失活^[11],将盐再缓慢加回,发现可恢复酶活性. *H. Cutirubrum* (红盐盐杆菌)的异柠檬酸脱氢酶,于低盐浓度中不具活性,用 4mol/L 的 NaCl 透析,得到具活性的酶,这种酶最适活性的盐浓度为 0.5 - 1.5mol/L,但在近 30% 的 NaCl 中最稳定,即酶最大活性的 NaCl 浓度远低于这株菌生长所需的最适 NaCl 浓度.由海洋细菌中分离的酶,就它们与盐的依存关系可分为三类:第 1 类为不加盐时,酶活性最高,加盐就受抑制.在这类嗜盐菌中可能存在某种保护机制,通过对 *Vibrio alginolyticus* 研究,高浓度的 K^+ 可作为保护因子对盐抑制而起着作用.第 2 类为不加盐时有一定活性,加盐时酶活力进一步增强,最适盐浓度低于细胞内离子浓度,过高浓度的盐会使酶活性受抑制,第 3 类酶为不加盐时几乎不显示活性,由于盐的作用使酶强烈的活性化.

1.3 嗜盐菌质膜、色素及 H^+ 泵作用

嗜盐菌具有异常的膜.嗜盐菌细胞膜外有一个亚基呈六角形排列的 S 单层,这个所谓的‘S 单层’由磺化的糖蛋白组成,由于磺酸基团的存在使 S 层呈负电性,因此使组成亚基的糖蛋白得到屏蔽,在高盐环境中保持稳定.限制通气,即低氧压或厌氧情况下光照培养, *H. halobium* 产生红紫色菌体,这种菌体的细胞膜上,有紫膜膜片组织,约占全膜的 50%,由 25% 的脂类和 75% 的蛋白质组成.现已发现四种不同功能的特殊的色素蛋白——视黄醛蛋白,即细胞视紫红质 (*bacteriorhodopsin*, bR)、氯视紫红质 (*Halorhodopsin*, hR)、感光视紫红质 I (*Sensory rhodopsin*, SRI) 及感光视紫红质 (SR)^[12],对盐生盐杆菌的 bR 研究最透彻,由三个 bR 分子构成的三聚体可在细胞膜上形成一个刚性的二维六边形的稳定特征结构,即紫膜.紫膜中含有的菌视紫素或称视紫红质,是由菌视蛋白与类胡萝卜素类的色素以 1:1 结合组成的.嗜盐菌的菌视紫素可强烈吸收 570nm 处的绿色光谱区,菌视紫素的视觉色基(发色团)通常以一种全—反式(all trans)结构存在于膜内侧,它可被激发并随着光吸收暂时转换成顺式状态,这种转型作用的结果使 H^+ 质子经转移到膜的外面,随着菌视紫素分子的松弛和黑暗时吸收细胞质中的质子,顺式状态又转换成更为稳定的全—反式异构体,再次的光吸收又被激发,转移 H^+ ,如此循环,形成质膜上的 H^+ 质子梯度差,即 H^+ 泵,产生电化势,菌体利用这种电化势在 ATP 酶的催化下,进行 ATP 的合成,为菌体贮备生命活动所需要的能量.

1.4 排盐作用

嗜盐菌的生长虽然需要高钠的环境,细胞内的 Na^+ 浓度并不高,如盐杆菌光介导的 H^+ 质子泵具有 Na^+ / K^+ 反向转运功能,即具有吸收和浓缩 K^+ 和向胞外排放 Na^+ 的能力. K^+ 作为一种相容性溶质,可以调节渗透压达到细胞内外平衡,其浓度高达 7mol/L,以维持内外同样的水活度^[13].例如嗜盐厌氧菌、嗜盐硫还原菌及嗜盐古菌是采用细胞内积累高浓度 K^+ 来对抗胞外的高渗环境^[14].例酵母中的 Na^+ / H^+ 反向载体可以将多余的盐分排出体外,提高酵母的耐盐性.

1.5 嗜盐细胞内溶质浓度的调节

因为水往往是从小溶质浓度的地方流向较高溶质浓度的地方,所以悬浮在高盐溶液中的细胞将失去水分,并成为脱水细胞,除非它的细胞质内含有比其环境更高的盐(或一些其它溶质).嗜盐微生物由于产生大量的内溶质或保留从外部取得的溶质而得以在高盐环境中生存^[15].氨基酸在嗜盐细胞内溶质浓度调节中起着重要作用.随培养基食盐的增加,氨基酸浓度有规律的增加,其中主要是谷氨酸和脯氨酸,及甘氨酸,它们具有渗透保护作用,是溶质浓度调节的重要因子^[16].研究表明,革兰氏阴性菌在高盐条件下,主要积累谷氨酸,以抵抗外界的高渗透压,同时积累 K^+ 以中和谷氨酸所带的负电荷;革兰氏阳性菌则主要积累脯氨酸和 - 氨基丁酸, K^+ 变化不明显.嗜盐菌的细胞质蛋白特异地含有许多低分子量的亲水性氨基,这样,在高离子浓度的胞内环境中,细胞质可呈现溶液状态,而疏水性氨基酸过多则会趋向成簇,从而使细胞质失去活性.如嗜盐真核生物、嗜盐真细菌和嗜盐甲烷菌在胞内积累大量的小分子极性物质,如甘油、单糖、氨基酸及它们的

衍生物,它们在胞内能够被迅速地合成和降解构成渗透调节物质,帮助细胞从高盐环境中获取水分。

1.6 耐盐基因片段

八十年代以来,细菌耐盐机制的研究日益深入,以大肠杆菌和其它遗传背景较清楚的肠道细菌为材料进行的工作,使细菌渗透调节机理推进到分子水平。已相继分离和鉴定了与渗透保护物合成途径有关的结构基因,如 proABC 和 bet 基因,以及转录表达受到渗透压调控的一些操纵子,如 kdp 操纵子,pro 和 opu 系统以及作为全细胞调节因素的 ompR 系统^[17-18],并且进行了有关耐盐基因的分选和转移研究^[19-21]。1990 年, Javed^[22]从巴基斯坦的盐碱地中生长的卡拉草根部分离得到一株克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) 发现其唯一的内源质粒(约 50kb)与耐盐有关。Hasnain S 等^[23]从耐盐菌质粒中挑选两个质粒(pSH1418 和 pSH1451)研究,发现 pSH1451 有编码复制区功能,且可加到低拷贝数 Incp 载体上,在大肠杆菌中已克隆的质粒 pSH1418 和 pSH1451 具有耐盐特性,但表型是不稳定,质粒 pSH1451 序列中有许多能编码耐盐的阅读框(ORFs),其中 orf4 和 orf5 片段可以一起作用转录一个分子如促进耐渗透性的天门冬氨酸。有关嗜盐菌遗传学方面的研究国外已有大量报道^[24-25],但由于这类菌难以得到合适的选择标记,突变株不稳定等特性,进展缓慢,目前在嗜盐菌中发现了质粒,但这些质粒的分子量较大,拷贝数低,缺乏便于克隆外源 DNA 的单一酶切位点,而不能用作载体^[26-27]。

2 应用

嗜盐细胞由于其特殊的结构特点和理化性质,它的应用方式已倍受注目,它用于发酵生产,具有抵抗高盐浓度环境胁迫能力,不易污染,可减少发酵工艺,降低成本,在高盐污水的处理方面也发挥重要作用,同时将极端嗜盐菌紫膜特性应用于电子领域,开发新科技产品,也将成为可能。

2.1 多聚化合物的生产

聚羟基丁酸(PHB)具有热塑性、生物降解和生物相容性,嗜盐菌在一定条件下能大量积累 PHB 用于可降解生物材料的开发。目前主要应用于医学领域,如外科手术、病人碳源外充等。

2.2 食品和食品工业

嗜盐菌在食品和食品工业中的应用表现在食用蛋白和食用添加剂生产上。例如在德国,应用化学诱变筛选到一株具嗜盐特性的枯草芽孢杆菌,能分泌出菌体内合成的脯氨酸作为蛋白质来源,它可以以海水作培养基质,借光合机制来生产。另外嗜盐菌体内类胡萝卜素、 α -亚油酸等含量较高,可用于食品工业。

2.3 能源开发上的应用——石油开采

嗜盐菌的酶是工业上耐盐酶的重要来源,研究人员正在探索把嗜盐极酶用到提高从油井中提取原油量的方法中,用嗜盐极酶可分解掉瓜儿豆胶的粘性^[28]。

2.4 生物电子方面的应用

生物学向电子学渗透形成了生物分子电子学,极端嗜盐菌产生的以细菌视紫质为代表的一类含视黄醛蛋白质作用机理有望应用于此。在光照条件下视黄醛类蛋白能使介质酸化,嗜盐菌的紫膜,可以吸收光能,将质子从细胞内转运到细胞外,产生跨膜化学电势,用以合成 ATP,即它具有光驱质子泵的功能,是最简单的光能转换器,有可能利用它制成光开关、改写型光盘、信息存储器以及非线性光学材料。BR 在光照射循环时,会按一定的顺序发生结构变化,结构变化过程中的不同状态就能起到光开关的作用,可以分别表示信息“0”或“1”,用来记录数字信息。目前正企图将菌视紫素制成离体物,用于合成 ATP、太阳能电池、淡化海水、生物芯片等方面的研究以及解决宇航中人类能源不足问题。

2.5 培育转基因植物

通过基因工程手段,使细胞内积累甜菜碱、山梨醇、甘露醇、海藻糖等相容性溶质^[29-31],能够不同程度地提高转基因植物的耐盐性。例如将细菌中的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(MtID)、6-磷酸三梨醇脱氢酶基因(GutD)、脯氨酸合成酶基因(ProB)转入烟草,可使转基因植物在 2%NaCl 下正常生长^[32]。

总之,嗜盐菌是极端环境微生物的重要类群之一,在生产上的应用以及在新的酶工业领域,生物电子领域的可能应用,展现了它的潜在应用前景。例如盐生盐杆菌等,由于它们在细胞壁、细胞膜组成、rRNA、tRNA 诸方面具有古生物学特征^[33-34],又由于它们特殊的细胞学、生理学、生物化学等特征而受到国内外学者的广泛重视,从不同地质年代的古盐矿层中分离保存完好的嗜盐古菌可用于考察物种的演变历史,是研究生物

进化的活化石,它们为生物进化、生命起源的研究提供新的材料.嗜盐菌资源极为丰富,应用现代生物工程开发新的有价值的嗜盐菌种、基因库(包括特异性的基因资源)和新的应用领域是今后的努力目标.了解嗜盐机理,寻找到与耐盐有关的基因片段,再将此片段转移入植物体内,在此基础上构建耐盐植物,进而充分利用盐碱土壤具有重要意义.

参考文献:

- [1] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [2] 徐毅,周培瑾. 嗜盐古菌的系统发育分析[J]. 微生物学报. 1996,36(2):79-86.
- [3] 万波,李安明,赵海等. 一株厌氧嗜盐菌的鉴定[J]. 微生物学通报. 1997,24(3):131-133.
- [4] Oren A, Ventosa A, Grant WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales[J]. International Journal of Systematic Bacteriology. 1997,47(1):233-238.
- [5] 王振雄,徐毅,周培瑾. 嗜盐碱古菌新种的系统分类学研究[J]. 微生物学报. 2000,40(2):115-120.
- [6] 张锐,曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究[J]. 微生物学通报. 2001,28(4):5-9.
- [7] Atlas RM and Bartha R, Effects of abiotic factors on microorganisms, In Microbial Ecology: Fundamental and Applications[M]. USA: The Benjamin Cummings Publ Comp. Inc. Menlo Park, 1987,233-262.
- [8] Prins RA. Adaptation of microorganisms to extreme environments[J]. FEMS Microbiol Rev, 1990,75:103-104.
- [9] 曾胤新,陈波. 低温微生物适冷特性及其在食品工业中的潜在用途[J]. 生物技术. 2000,10(2):32-37.
- [10] 史家梁,徐亚同,张圣章. 环境微生物学[M]. 上海:华东师范大学出版社,1993.
- [11] 徐恒平,张树政. 嗜极菌的极端酶[J]. 生物工程进展. 1997,17(1):2-5.
- [12] 辛化伟,阎章才,周培瑾. 盐生盐杆菌在不同营养条件下紫膜蛋白形成的差异. 微生物学报. 1999,39(3):220-225.
- [13] Robert H, Marrec CL, Blanco C, et al. Glycine betaine, carnitine and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of tetragenococcus halophila[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2000,66(2):509-517.
- [14] 刘铁汉,周培瑾. 嗜盐微生物. 微生物学通报. 1999,26(3):232-233.
- [15] Mimuru H, Nagata S, Matsumoto T. Concentrations and compositions of internal free amino acids in a halotolerant Brevibacterium sp in response to salt stress[J]. Biosci biotech Biochem. 1994,58(10):1873-1874.
- [16] Tiemen Van Der Heide, Bert Poolman. Glycine Betaine transport in Lactococcus Lactis is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity[J]. J. Bacteriology. 2000,182(1):203-206.
- [17] Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. Microbiol Rev. 1989,53:121-147.
- [18] Csonka LN, Hanson AD. Prokaryotic osmoregulation: genetic and physiology[J]. Annu Rev Microbiol, 1991,45:569-606.
- [19] 陈雪松,张海瑜,高为民,等. 苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关的DNA片段的克隆[J]. 微生物学报. 1999,39(6):489-493.
- [20] 杨国平,孟文茂,姜无忌. Tn5-Mob系统诱导耐盐基因转移[J]. 遗传. 1993,15(4):34-37.
- [21] Castillo RF, Varags C, Joaquin JN. Characterization of a plasmid from moderately halophilic eubacteria[J]. J Gen Microbiology, 1992,138:1133-1137.
- [22] Javed AQ, Malik KA. Evidence for a plasmid conferring salt-tolerance in plant-root associated diazotroph Klebsiella sp[J]. Biotec Letter. 1990,12(10):783-788.
- [23] Hasnain S, Thomas CM. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria[J]. Plasmid, 1996,36:191-199.
- [24] Pfeifer F, Weidinger G, Goebel W. Characterization of plasmids in halobacteria[J]. J Bacteriol, 1981,145:369-374.
- [25] 沈萍,陈娅静. 盐生盐杆菌的质粒及物理图谱[J]. 遗传学报. 1994,21(5):409-416.
- [26] Pfeifer F, Blaseio U. Insertion elements and deletion formation in a halophilic archaeobacterium[J]. J Bacteriol, 1989,171(9):5135-5140.
- [27] Rosario FC, Varags C, Joaquin JN. Characterization of a plasmid from moderately halophilic eubacteria[J]. J Gen Microbiology. 1992,138:1133-1137.
- [28] Madigan MT. 嗜极微生物[J]. 科学. 1997,8:34-37.
- [29] Tarczynski MC, Jense RG, Bohnert HJ. Stress protection of transgenictobacco by production of the osmolyte mannitol[J]. Science. 1993,259:1122-1124.
- [30] Galinski EA. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection[J]. Experientia. 1993,49:487-496.
- [31] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. Arch microbiol. 1998,170:319-330.
- [32] 卢青. 植物耐盐性的分子生物学研究进展[J]. 生物学杂志. 2000,17(4):9-11.
- [33] 陈文新. 细菌系统发育[J]. 微生物学报. 1998,38(3):240-243.
- [34] 孙广秀,江爱民,沈萍. 具有真细菌基因启动子活性的盐生盐杆菌质粒DNA片段[J]. 遗传学报. 1997,24(4):380-384.

(下转第193页)

THE ADVANTAGE OF WINTER TOURISM CLIMATIC RESOURCES IN MOUNT HUANGSHAN

WU You-xun, HU An-xia, CHENG Xiao-nong, WANG Hai-lian,
XI He-ping, CHENG Xiang-min, BAO Ming-mu, PAN Rong-shan
(Xuancheng Meteorological office, Xuancheng 242000, China)

Abstract : The climatic resources of winter tourism in Mount Huangshan are analysed by the meteorological data obtained from 1956 - 1966. The results show : The air temperature in winter is not low in Mount Huangshan ; the average air temperature is - 1.7 in Guangmingding and the average humidity is 62 % , and this is the lowest relative humidity in the whole year , the sunshine duration is long , which makes it probable to see the sunrise and sunset. The cloud sea days seen in winter cover 35 % or 37 % of that in the whole year ; The average snow day is 26.9d , snow-covered day is 36.8d , and the average rime day is 44.3d. Winter is the best seasons to enjoy the cloud sea , snow , sunrise and sunset. The winter season , with more precipitation , the least evaporation , plenty of water resource and low grade of forest fire , is fit for large number of tourists. Mount Huangshan should be made prosperous in tourism in winter with reference to foreign experience of tourism development and by improving tourism activities in winter.

Key words : Mount Huangshan ; climatic resources ; winter tourism

* * * * *

(上接第 184 页)

STUDY ADVANCE ON THE HALOPHILE

LIU Ai-min
(College of Life Sciences , Anhui Normal University , Wuhu 241000 , China)

Abstract : People pay attention to halophiles as a kind of new microorganism resources in recent years. People are interested in its salt-resisting mechanism in theory research and purple membrane and the development of salt-resisting enzyme in applying fields.

Key words : halophile ; salt-resisting mechanism ; uses