

一株特耐酸酵母 R1 的分离及其耐酸机理研究

张国顺 洪青 刘智 张晓舟 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘要:从江西某铜矿的污泥中分离到一株特耐酸酵母菌 R1 (*Rhodotorula* sp.), 能在 pH 值 1.5~6.0 的范围内生长, 最适生长 pH 为 3.0, 属于嗜酸菌, 初步鉴定为红酵母属 (*Rhodotorula* sp.). R1 在不同培养基中的耐酸能力基本相同. pH 冲击实验显示, R1 通过泵出 H^+ 吸收 K^+ 来维持胞内 pH 的稳定, 表明膜 H^+ -ATPase 和 K^+ 在 R1 耐酸中发挥作用. R1 细胞膜的 H^+ -ATPase 活性与 R1 生长的 pH 呈负相关. 通过 PCR 克隆了 R1 的 H^+ -ATPase 基因 (*pma*), 并进行了测序, 序列比较显示该基因的保守性很高.

关键词:嗜酸菌, 耐酸机理, K^+ , H^+ -ATPase

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2004)05-0631-05

在自然界中存在一些极端自然环境 (Extreme Natural Environments), 如低温、高温、高压、强碱、强酸、干燥、辐射、高盐、低营养等, 这些环境中存在一些特殊微生物, 被称为极端微生物 (Extremophiles), 嗜酸菌是其中一个很重要的类群. 目前研究的比较多的是细菌中的氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 和氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*), 它们的最适生长 pH 值在 2.5 左右, 可以从含硫化物中获得能量, 并产生硫酸, 在生物沥滤中广泛应用^[1]. 低 pH 对大多数微生物有毒害作用^[2], 但嗜酸微生物必须在低 pH 下才能生长. 一般微生物在生长繁殖时胞质 pH 必须在中性左右, 如 *Spermatosopis acidophila* 在 pH1.0 时生长最适, 但胞内 pH 却维持在 7^[3]. 有关微生物抵抗低 pH 的机理有多种说法, 目前对此报道较多的是细菌的耐酸机理, 如质子泵、大分子的保护和修饰、细胞膜组分的变化、胞内碱性物质的产生、细胞浓度、代谢途径的改变和其它调节因子对耐酸都有作用^[4]. 但很多假设目前还缺乏充足的证据. 酵母菌中有些种类如椭圆酵母、点滴酵母和酿酒酵母最低可分别在 pH2.5、pH2.0 和 pH1.9 中生长^[2], 而一般酵母菌适合于 pH3.8~6.0 的酸性环境, 最低 pH 为 2.5, 最高为 8.0. 对极端嗜酸的 *Dunaliella acidophila* 研究发现, K^+ 能够促进 H^+ -ATPase 的活性, 作用部位为质膜内侧, 而不是外侧^[5]. H^+ -ATPase 在酵母中起碱化胞质作用, 为调控胞内 pH 所必需^[6], pH 还能影响该酶的表达量^[7,8].

本文考察了 pH 冲击下 R1 胞外 pH 及 Na^+ 、 K^+ 离子浓度的变化, 测定了不同 pH 培养下的 R1 细胞膜上 H^+ -ATPase 的活力, 并克隆和测序了 R1 的细胞膜 H^+ -ATPase 基因 (*pma*), 对 R1 的耐酸机理进行了探索, 阐述了耐酸与 Na^+ 、 K^+ 离子以及膜 H^+ -ATPase 酶的关系, 初步揭示了其耐酸的机理.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:取江西某铜矿排水沟中的酸性污泥作为实验的分菌样品.

1.1.2 菌株和质粒:菌株 R1 (*Rhodotorula* sp.) 和白色假丝酵母 J1 (*Candida* sp.) 为本实验室分离和保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 质粒 pUC19 为本实验室保存.

1.1.3 酶和引物:限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品, 溶菌酶为华美生物工程公司产品, 引物由 TaKaRa 公司合成.

1.1.4 培养基:LB 培养基:每升含蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 10g, Amp 使用浓度为 100mg/L; YPD 培养基^[10]:每升含葡萄糖 2g, 蛋白胨 2g, 酵母抽提物 1g; 无机盐培养基 (MM):每升含葡萄糖 10g, $(NH_4)_2SO_4$ 5g, 蛋白胨 0.5g, $MgSO_4$ 0.1g, $FeSO_4$ 0.1g; 豆芽汁培养基:每升含黄豆芽 200g, 蔗糖 20g. pH 均根据需要用 HCl 调节.

基金项目: 高校博士点专项科研基金资助项目 (2000030711); 江苏省环保厅资助项目 (苏环科 2000 年 21 号)

* 通讯作者. Tel/Fax 86-25-84396314, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 张国顺 (1979-), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学和分子生物学研究. E-mail: sheyangzhang@sohu.com; 洪青为本文并列第一作者.

收稿日期: 2004-01-16, 修回日期: 2004-05-08

1.2 菌株的分离纯化和鉴定

取污泥样品 10g,加入豆芽汁-蔗糖培养基中 (pH 2.0 左右) 并加入几粒玻璃珠,于 30℃ 180r/min 摇床培养,每 3d 按 10% 接种量转移至新鲜的培养基中,结合镜检,富集耐酸酵母,最后取培养液进行系列稀释后涂豆芽汁-蔗糖培养基平板,挑取单菌落、纯化。由于酸性环境中,琼脂在高温灭菌时水解液化,室温时不能凝固,操作时采用琼脂和对应酸性培养基分开灭菌,冷却至 60℃ 左右,合并两者即可。对菌株进行形态及生理生化实验,参照文献 [9] 鉴定到属。

1.3 R1 总 DNA 提取和 PCR 条件

参照文献 [10],用 SDS-玻璃珠法裂解细胞,SEVAG 抽提,再用无水乙醇沉淀得 R1 的总 DNA。根据 GenBank 已经登录的 H⁺-ATPase 基因 (*pma*) 序列设计一对引物: 5'-CGCGAGCTCATGACTGAT-ACATCATCCTCT-3', 5'-CGCAAGCTTTTAGGTTTCC-TTTCGTGTTG-3'; 以 R1 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。50μL 体系:模板 1μL, dNTP (2.5mmol/L) 4μL, 引物 (1mmol/L) 各 1μL, 10 × Buffer 5μL, Mg²⁺ (2.0mmol/L) 3μL, *Taq* 酶 (5U/μL) 0.5μL, 超纯水 35.4μL, PCR 循环条件: 95℃ 2min; 94℃ 30s, 64℃ 30s, 72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。

1.4 pH 冲击实验

将发酵罐中最适 pH 下培养至稳定期的 R1 移种 5L 至全自动发酵罐 (7L), 根据预实验结果在 100r/min 下加 HCl 调节到所需 pH, pH 从自动控制面板读出。Na⁺、K⁺ 浓度的测定: 定时从种子罐中取出菌液离心收集上清, 稀释后用原子吸收分光光度计测定。每个处理重复 3 次。

1.5 细胞膜分离和 H⁺-ATPase 活力的测定

参考文献 [11], 将在不同 pH 下生长至对数期的 R1 细胞离心洗涤两次, 置于冰上, 用缓冲液 (2.5mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 50mmol/L Tris, pH 7.5) 悬浮, 在 19500lb/in² 下 French 破碎后立即用 2mol/L Tris 将 pH 调到 7.25, 5000g 离心 10min 两次, 上清在 30000g 下离心 1h 得细胞质膜。ATPase 酶活分析 [11] 酶活用 pH 6.0 的 50mmol/L MES-Tris 缓冲液 (15mmol/L MgSO₄, 15mmol/L ATP, 50mmol/L KNO₃, 0.2mmol/L 的钼酸盐, 5mmol/L Na₂N₃) 测定。120μL 的反应混合物在 28℃ 下水浴 15min, 加入 130μL 的终止液 (1% SDS, 100mmol/L 的钼酸盐, 0.6mol/L 的 H₂SO₄, 0.8% 的抗坏血酸盐), 25℃ 水浴 10min 后测 A₆₂₀ 释放出的磷酸盐数量根据标准曲线计算。对

照为加样后立即加终止液的处理。每个处理重复 3 次。蛋白含量测定用 Bradford 法 [12]。

2 结果和讨论

2.1 菌株的分离鉴定和生物学特性

通过富集培养和分离得到一株能在 pH 为 2.0 的豆芽汁培养基中生长, 且能产红色色素的酵母菌; 菌落为圆形、有乳状凸起质地光滑, 菌体为卵形或椭圆形、无假菌丝, 繁殖方式为多边芽殖、无有性繁殖; 葡萄糖发酵实验和肌醇实验结果为阴性, 硝酸盐、脲酶和 DBB 实验结果为阳性, 不能产淀粉、类淀粉化合物, 最适生长温度为 30℃。根据这些结果, 将该菌株初步鉴定红酵母属 (*Rhodotorula* sp.), 并把它命名为 R1。

2.2 R1 在不同培养基中的耐酸情况

从图 1 可以看出, R1 在不同培养基中生长的 pH 范围均为 1.5 ~ 6.0, 最适 pH 均为 3.0, 具有很强的耐酸能力。但在相同 pH 下不同培养基中生物量有所差异, YEPD 中最高, PDA 次之, MM 最低, 这可能与营养等因素有关; 当 pH 高于 6.0 时, 菌株的生长受到严重抑制, 这些特征和嗜酸菌的特征相符合, 因此把 R1 归为嗜酸菌。

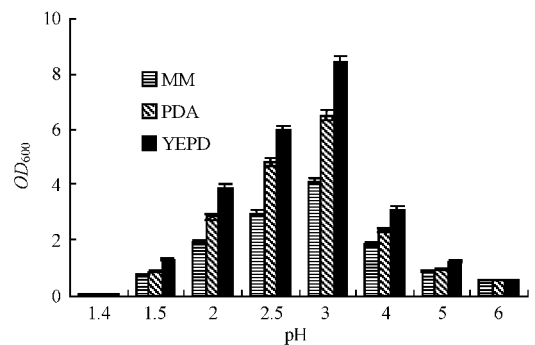


图 1 不同培养基中 R1 的耐酸特性

Fig. 1 The acid-tolerance of R1 in different medium

2.3 K⁺ 对 R1 耐酸的影响

K⁺ 在细菌耐酸过程中可能起着平衡作用, 即胞质酸化后要从胞外运入 K⁺ 弥补泵出 H⁺ 导致的离子不平衡 [13]。图 2 为酵母 R1 在相同 pH 不同 K⁺ 浓度下培养的生长情况, 在 pH 1.5 时, 6mg/L 以下菌体不长, 8 ~ 20mg/L 时, R1 的生物量呈升高趋势, 超过 20mg/L 时对生物量没有影响; 而在最适生长 pH 时, 只要有 K⁺ 菌体就会生长, 超过 10mg/L 时菌体生物量基本一样。表明在 pH 1.5 时 R1 在 K⁺ 浓度低于 6mg/L 不能生长的原因是缺乏足够的 K⁺ 来抵抗低 pH, 而不是 R1 生长对 K⁺ 的需要造成的, 这也证明

了 K⁺ 在 R1 耐酸中的作用。

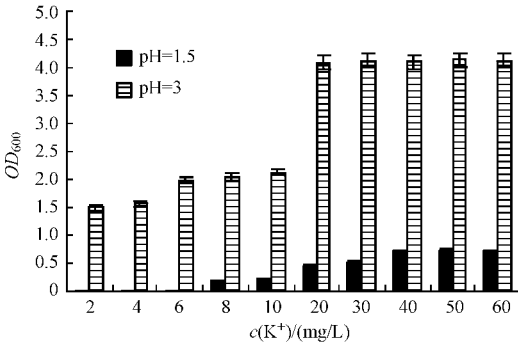


图 2 K⁺ 对 R1 耐酸的影响

Fig.2 Effect of K⁺ on the acid-tolerance of R1

2.4 pH 冲击对 R1 生长的影响

将在 pH1.5 和 pH3.0 中培养至对数期的 R1 分别接种到 pH3.0 和 pH1.5 的培养基中培养 (图 3), 结果发现从 pH1.5 接种到 pH3.0 中的菌体延滞期 (14h) 明显大于从 pH3.0 接种到 pH1.5 中的菌体延滞期 (8h)。表明高 pH 的冲击对菌体影响大, 证明了 R1 为嗜酸菌, 这和盐浓度冲击对嗜盐菌的影响类似^[14]。

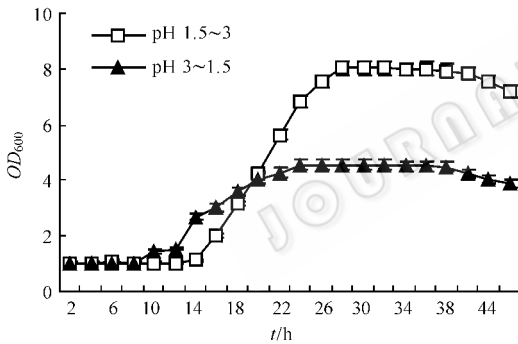


图 3 pH 冲击对 R1 生长的影响

Fig.3 Effect of pH shock on the growth of R1

2.5 pH 冲击对 R1 培养液 pH 的影响

菌体要维持生长, 胞内的 pH 必须相对稳定在中性左右, 以保证生物分子的功能正常发挥, 这在细菌研究中已得到验证。多种胞内 pH 测定方法表明 *E. coli* 能在很宽的生长 pH 范围内维持胞内 pH 在中性^[15]。在细菌如何维持胞内 pH 稳定的机理中提得最多的是质子泵和 Na-K 泵, Booth、Padan 等研究认为, 细菌在酸性环境下生长时是通过泵出 H⁺ 和吸收 K⁺ 来维持胞内 pH 稳定的; Mason 等在酵母研究中发现将其从 pH6 变化到 pH3 时, 膜向外泵质子的能力提高^[7]。酵母是真核生物, 在细胞膜上没有原核生物用来产生 ATP 的质子泵, 但质膜上有 H⁺-ATPase, 具有泵出质子的功能^[13]。

以白色假丝酵母 J1 (最低生长 pH 为 3.1, 耐酸能力远低于 R1) 为对照, 做了 J1 和 R1 的冲击试验。从图 4 可以看到, 在冲击到 2.01 时, J1 的 ΔpH ($\Delta pH = pH_i - pH_0$, i 表示时间, pH_0 表示冲击后菌液的 pH 值) 不断增加, 表明不断有 H⁺ 进入其胞内, 而在冲击到 pH2.32 和 pH2.50 时, pH 值很快下降, 然后稳定, 再上升, 最后又降低, 表明不断有 H⁺ 泵出菌体, 而 R1 除在前 10min ΔpH 为正值外 (图 5), 以后 ΔpH 均为负值, 即在高低冲击下都能泵出 H⁺。两者最大的不同在于低 pH 冲击下短时间内的表现, 前者在冲击到 2.01 时 pH 一直上升, 表明膜的抵抗能力很快丧失, H⁺ 不断进入菌体, 而后者 pH 有短暂提高后一直下降至稳定 (短暂提高表明 H⁺ 是逐步进入, 反映了膜对高浓度 H⁺ 有屏障作用), 然后很快恢复抗酸能力, 不断泵出 H⁺, 可以看出其更耐酸的原因。尽管在 pH1.0 时 R1 仍能泵出 H⁺, 但与冲击到 pH1.44 时比较, 泵 H⁺ 能力有所下降, 最终前者 ΔpH 值变化比后者高了 0.02 单位, 即前者菌体中的 H⁺ 浓度要远远大于后者, 从而导致不能生

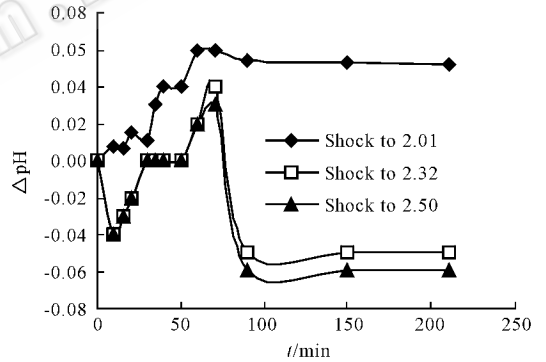


图 4 pH 冲击下 J1 胞外 pH 的变化

Fig.4 The change of surrounding pH of J1 caused by pH shock

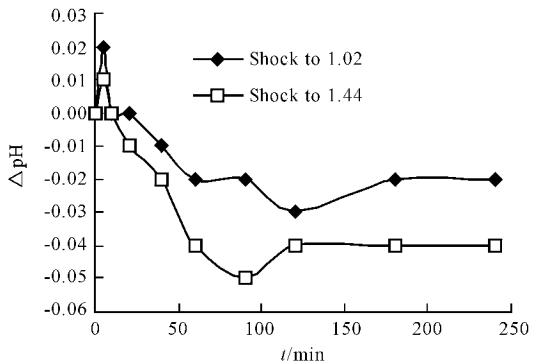


图 5 pH 冲击下 R1 胞外 pH 的变化

Fig.5 The change of surrounding pH of R1 caused by pH shock

长。另外平板涂布表明, R1 在冲击到 1.02 时 8h 内菌落数没有下降, 表明上述现象都是有活力的菌体细胞的反应。

为了进一步验证 H^+ 的泵出效应,还做了冲击时添加和不添加解偶联剂 2,4-二硝基苯酚(2,4-Dinitrophenol)的实验(图 6)。不添加时,pH 值短暂升高后迅速下降,添加时,pH 值短暂升高后下降,然后又持续上升,表明有 H^+ 不断进入菌体。短暂升高是高浓度 H^+ 冲击导致 H^+ 不断进入菌体所致,下降为耐酸系统在起作用,但随着低 pH 和解偶联剂的作用下细胞膜逐渐失去其屏障功能, H^+ 又回到胞内,导致菌液 pH 不断上升。到 150min 时仍在上升,表明耐酸系统活性仍没完全丧失,否则 H^+ 应很快进入胞内,达到平衡^[16]。从上面的实验中可以肯定 K^+ 和 H^+ -ATPase 在耐酸中发挥了作用。

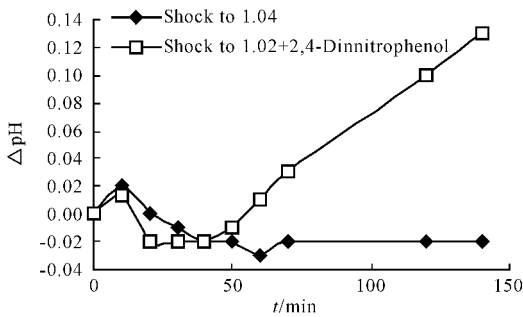


图 6 2,4-二硝基苯酚对 pH 冲击效果的影响

Fig.6 Effect of 2,4-Dinitrophenol on the pH shock of R1

2.6 pH 冲击下 R1 培养液 Na^+ 和 K^+ 浓度的变化

从图 7 可以看出,冲击过程中菌液的 K^+ 浓度发生了显著变化,而 Na^+ 浓度变化呈动态平衡。冲击中, K^+ 首先均呈下降趋势,然后又都有所回升, K^+ 浓度的明显降低表明确实有 K^+ 进入到菌体,维持胞内离子平衡并可能对 H^+ -ATPase 活性起促进作用^[5]。那么在 R1 嗜酸生长的过程中 H^+ -ATPase 和 K^+ 发生作用可能有两种:一是独立发生作用,因为有报道说 H^+ -ATPase 在没有 K^+ 存在时也能泵出质子, K^+ 是通过其他系统在跨膜电动势下进入细胞^[17] 进入的 K^+ 仅起平衡泵出的 H^+ 作用;另一种

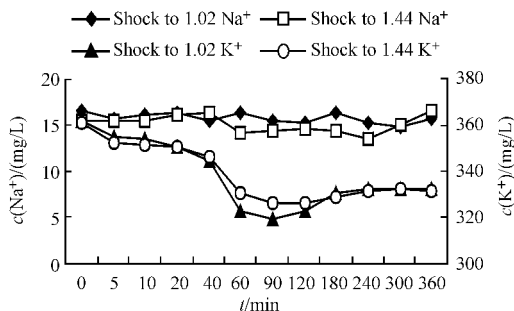


图 7 pH 冲击下 R1 胞外 Na^+ 和 K^+ 浓度的变化

Fig.7 The change of concentration of Na^+ and K^+ in medium under pH shock

是共同作用,即进入细胞的 K^+ 对 H^+ -ATPase 活性起促进作用,以抵抗胞外的极端酸环境^[5]。具体作用有待进一步研究。 Na^+ 浓度的动态平衡表明其在耐酸系统中可能起着中介作用,这符合 Na^+ 在生物膜上的运输特性,即同向运输和反向运输共同进行,导致其在菌液中的浓度保持基本不变。

2.7 pma 的扩增及不同生长 pH 对 R1 细胞膜 H^+ -ATPase 活力的影响

将 PCR 产物进行电泳后,用 PCR 回收试剂盒回收片段,*Hind*III 和 *Eco*R I 双酶切后连接到经过同样双酶切 pUC19 上,转化 DH5 α , 蓝白斑筛选,挑选白斑菌落,提质粒,双酶切验证插入片段大小(2.8kb 左右);测序由 TaKaRa 公司完成。将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的 *pma* 序列进行同源性比较,结果表明,R1 的 *pma* 和许多酵母菌的 *pma* 序列同源性为 85% 以上,表明该基因非常保守。

分离了在不同恒定 pH 培养下 R1 的细胞质膜并测定了其上面所含的 H^+ -ATPase 活力。结果表明酶活与生长 pH 值呈负相关,pH1.5 时酶活最高,pH6.0 时酶活最低。而该酶的最适 pH 为 6.5,因此推断 pH1.5 时酶活力高的原因是 H^+ -ATPase 在低 pH 下酶量高于其它 pH 所致,即 R1 在低 pH 下生长时 H^+ -ATPase 表达量会增加,而酶表达量方面的差异则需要从 *pma* 的 mRNA 水平上进行进一步研究。

参考文献

- [1] 周顺桂,周立祥,黄焕忠.生物淋滤技术在去除污泥中重金属的应用.生态学报,2002,22(1):125-133.
- [2] 池振明.微生物生态学.山东:山东大学出版社,1999,35-36.
- [3] Albertano P, Pinto G, Santisi S, et al. *Spermatosopsis acidophila* Kalina, a little known alga from highly acidic environment. *G Bot Ital*, 1982, 115: 65-76.
- [4] Paul D C, Colin H. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacterial to low pH. *MMBR*, 2003, 674: 29-453.
- [5] Israel S, Uri P. Purification and properties of a plasma membrane H^+ -ATPase from the extremely acidophilic alga *Dunaliella acidophila*. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1055-1061.
- [6] Ramon S, Morten C, Kielland B, et al. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+ + K^+), K^+ - and Ca^{2+} -ATPase. *Nature*, 1986, 319: 689-693.
- [7] Mason A B, Thomas B K, Brian C M, et al. Regulation and pH-dependent expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *BBA*, 1998, 1372: 261-271.
- [8] Foster J W, Hall H K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella*. *J Bacteriol*, 1990, 172: 771-778.

- [9] Barnett J A , Payne R W , Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991, 6.
- [10] Adams A , Gottschling D E , Kaiser C A , et al. 酵母遗传学方法实验指南. 刘子泽译. 北京: 科学出版社, 2000, 87 - 88.
- [11] Brian C M , Myra B K , Jean A M , et al. Cloning and characterization of the plasma membrane H^+ -ATPase from candida albicans. *J Bacteriol* ,1991 ,**173** 6826 - 6836.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyeing binding. *Anal Biochem* , 1976 , **72** 248 - 254.
- [13] Booth I R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* , 1985 **49** 359 - 378.
- [14] 何 健 崔中利 刘 智 等. 耐盐降解苯乙酸类菌株 A1 (*Arthrobacter* sp.) 的分离和特性研究. *环境科学学报* ,2002 ,**22** : 301 - 305.
- [15] Hiroshi K , Hiromi S , Tomohito K. Bacterial strategies to inhabit acidic environments. *J Gen Appl Microbiol* ,2000 **46** 235 - 243.
- [16] Dan Z , Vered A , Shimon S , et al. *Escherichia coli* intracellular pH , membrane potential , and cell growth. *J Bacteriol* , 1984 ,**158** : 246 - 252.
- [17] Ramon S. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* , 1989 , **40** 61 - 94.

Isolation and Preliminary Mechanism of Acid Tolerance of A Acidphilic Yeast Strain R1

ZHANG Guo-Shun HONG Qing LIU Zhi ZHANG Xiao-Zhou LI Shun-Peng*

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment ,Ministry of Agriculture ,College of Life Science , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : A yeast strain R1 was isolated from sludge samples collected from a copper mine. This strain was able to grow under pH value of 1.5 ~ 6.0 with optimal growth pH being 3.0 , which was the typical characters of acidophilies. R1 was preliminary identified as (*Rhodotorula* sp.). The ability of acid tolerance of R1 in different mediums was almost same. The result of pH shock experiment showed that R1 could maintain a neutral cytoplasmic pH by pumping H^+ and absorbing K^+ , which proved the function of H^+ -ATPase and K^+ in its acidic tolerance. Its H^+ -ATPase activity showed a negative correlation with the growth pH of R1. The gene encoding H^+ -ATPase (*pma*) was cloned by PCR and sequenced , which had high homology with that of other yeast strain.

Key words : Acidophilies , Mechanism of acid tolerance , K^+ , H^+ -ATPase

Foundation item : Special Fund for PhD Program of Colleges (2000030711) ; The Project of Jiangsu Environmental Bureau (2000.21)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-25-84396314 E-mail lsp@njau.edu.cn

Received date 01-16-2004

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国农业气象》是中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所(原农业气象研究所)主办的反映我国农业气象科学研究进展的学术刊物。主要刊登有关农林水产业与气象有关的学术论文、研究报告和国内外有关专题研究动态综合评述等,涉及包括全球变化、区域农业气候、减灾防灾、干旱与节水农业、作物气象与农田小气候、农业病虫害、农业生态环境、电子计算机等高新技术在农业气象上应用等方面的内容。本刊为中央级刊物,为国家科技部“中国科技核心期刊”;“中国科学引文数据库来源期刊”核心期刊;“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊;“中国农业科技论文数据库”统计源期刊。欢迎国内外专家、学者、专业人员、大专院校师生投稿和订阅。

《中国农业气象》为季刊,16开本64页,每期单价6.00元,全年24.00元(含邮资)。全国各地邮局订阅,国内刊号CN11-1999/S,邮发代号82-126。也可直接来函到编辑部购买及补订。另目前尚有1979至2002年少量合订本,若有需要可直接与本编辑部联系。