

南极海冰细菌科尔韦氏菌低温适应性的初步研究

王全富¹, 侯艳华¹, 缪锦来², 徐仲¹, 阚光锋¹, 李光友², 沈继红²

(1. 哈尔滨工业大学(威海) 海洋学院, 山东 威海, 264209; 2. 国家海洋局第一研究所 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛, 266061)

摘要:以南极海冰细菌(*Colwellia* sp. NJ341)为材料,从蛋白质、酶和脂肪酸等方面对0℃下低温适应性进行初步探讨。结果表明,与15℃相比,0℃下菌株NJ341的生长量和蛋白质含量处于较高值;不饱和脂肪酸C16:1 ω 9和C16:1 ω 7含量显著增加($P<0.05$),而C18:1显著下降($P<0.05$);脂质过氧化的重要参数丙二醛(MDA)含量极显著增加($P<0.01$),但在4~-5℃变化幅度不大;谷胱甘肽硫转移酶(GST)活力在8~22℃温度范围内没有检测到,而在4~-5℃范围内其活力极显著增加($P<0.01$)。这些重要生理参数的变化将有助于了解低温微生物在接近冰点温度下的适应机制。[中国水产科学,2007,14(5):1027-1031]

关键词: *Colwellia* sp.; 低温适应性; 南极; 海冰细菌

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2007)06-1027-05

南极具有独特的地理及气候特征,其主要特点是变化极大的光照辐射、季节性的光照时间;常年水温极低(通常在-1.8~-2.0℃),在冬季最低温度可以达到-50℃;高盐度环境(海水中的盐度一般为34~35),海冰中盐囊和盐通道的盐度可达到150,从而形成了一个强辐射、酷寒和高盐度的自然环境^[1]。为了适应这种极端环境,生存于其中的微生物必然具备了相应独特的生理生化机制。目前,国内外对南极微生物的低温生境适应性已经从多方面做过研究,发现了低温微生物的诸多特点。其中比较重要的研究结果包括南极微生物可通过降低酶反应的活化能,产生在低温下具有较高酶活力的低温酶^[2-5];低温可以降低细胞质膜的流动性,影响与膜相关的细胞功能^[6];低温也影响DNA和RNA二级结构的稳定性,降低转录、翻译和DNA复制的效率,从而进一步影响蛋白质的合成^[7]。而关于微生物在接近冰点温度0℃的适冷机制报道较少。南极海冰细菌是研究微生物适冷机制的资源之一,本研究以南极海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 为研究材料,初步探讨其在接近冰点温度0℃时的适应性,以期了解南极微生物对低温的适应机制。

1 材料和方法

1.1 材料

南极海冰细菌(*Colwellia* sp. NJ341)由国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室从2001年第18次南极科学考察采集的南极海冰(68°30'E, 65°00'S)中分离获得。

1.2 温度设定

设置温度梯度为-5℃、0℃、4℃、8℃、15℃、20℃和22℃。每种温度设3个平行组。-5℃放置在冰柜里进行温度调控(培养的转速用磁力搅拌器设置),其他温度在温控摇床中设置。按5%接种量($A_{540\text{nm}}=0.650$)接入50 mL 2216E 液体培养基中,100 r/min 摇床振荡,不同温度培养96 h后,15 000 r/min离心15 min,收集菌体。菌体用蒸馏水洗3~4次,用于测定酶类、蛋白质和脂肪酸含量等指标。

1.3 菌株的生长测定

每隔1 d取样,以接种后培养基作对照,测定540 nm吸光值。

1.4 蛋白质含量的测定

离心后菌体用0.22 μm 微孔滤膜($\phi=45\text{ mm}$)

收稿日期:2007-01-15; 修订日期:2007-03-21.

基金项目:国家自然科学基金项目(40506005);哈尔滨工业大学(威海)校基金(NO. HIT(WH)B200614, HIT(WH)B200613);国家863计划(2007AA091905)。

作者简介:王全富(1976-),男,讲师,博士研究生,研究方向:极端环境微生物. E-mail: wangquanfu2000@126.com

过滤,然后用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 洗 3~4 次,冷冻干燥至恒重。采用 Bradford 法测定蛋白质含量(单位:mg/g 干重)。

1.5 细胞脂肪酸的分析

1.5.1 脂肪酸的抽提 采用改良的一步萃取法^[8]。取 40 mg 干燥菌体放入螺口试管中,加入 5 mL 提取液(氯仿,甲醇,盐酸体积比为 1:10:1),充氮,密封后于 75 ℃ 水浴中反应 1 h,冷却,加入等量水(5 mL)终止反应,用 1 mL 正己烷萃取脂肪酸,蒸馏水洗 3 次,每次 3 mL,然后用气-质色谱联用仪进行分析。

1.5.2 气相色谱(GC)测量条件 Agilent 6890N 气相色谱仪,色谱柱:HP-5MS, 30 m×0.25 mmID×0.25 μm, 气化室温度 250 ℃;传输线温度 280 ℃;色谱柱升温程序,初温 50 ℃,以 20 ℃/min 升至 280 ℃并保持 10 min;进样方式,分流进样;分流比,10:1;进样量,1 μL。质谱(MS):5973N 质谱仪,EI 离子源,倍增器电压 1 388 V,离子源温度 230 ℃,四极杆温度 150 ℃,全扫描(SCAN)质量范围为 45~500 mau,溶剂延迟时间为 3 min。

1.5.3 脂肪酸定性和定量分析 在 1.5.2 分析条件下,选择所加内标用标准样品(C_{18:0}),其他组分依据保留时间,根据各自的质谱图,在 NIST 质谱数据库进行自动搜寻,对图中的脂肪酸进行定性和定量分析。

1.6 谷胱甘肽硫转移酶(GST)活力的测定

GST 活力的测定以 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)为底物,用紫外分光光度法测定^[9]。1 个酶活单位(U)定义为在 25 ℃、每分钟催化形成 1 μmol/L 反应产物的酶蛋白量。

1.7 丙二醛(MDA)含量的测定

称 0.5 g 菌体沉淀,加 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液及少量石英砂,置冰浴中研磨提取,匀浆液 15 000 r/min 离心 20 min,取上清液定容至 5 mL,按 TBA^[10]方法测定 MDA 含量。取 1 mL MDA 提取液,加入 3 mL 27% 三氯乙酸及 1 mL 2% 硫代巴比妥酸,在 95 ℃ 水浴中保温 30 min 后,立即置于冰浴中冷却,15 000 r/min 离心 10 min,测 OD₅₃₂值,减去 600 nm 下非特异吸收值 OD₆₀₀,按 155 mmol⁻¹·L·cm⁻¹消光系数计算 MDA 含量,单位用每 1 g 菌体中所含 MDA 的量(nmol),即 nmol/g。

1.8 数据处理

用 Excel 所带工具计算标准偏差,以 SPSS11.5

统计软件进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 不同温度下南极海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 生长和蛋白质含量

不同温度下海冰细菌 *C. sp.* NJ341 生长和蛋白质含量见图 1。菌株 NJ341 最适生长温度为 8 ℃;随着温度升高,菌株生长速率快速下降;在 22 ℃ 生长仅为 8 ℃ 的 10%;当 0~8 ℃ 时,菌株生长一直处于较高状态,OD₅₄₀ 介于 3.489~4.283;当温度达到 -5 ℃ 时菌株依然能够生长,其生长量为最适温度的 43%。温度对其蛋白质含量的影响与生长呈现相同趋势,蛋白质含量在 8 ℃ 时达到最大值;随着温度升高,蛋白质含量变化幅度较大;当温度升高到 22 ℃ 时细胞内蛋白质含量下降到最低;而温度下降到 8 ℃ 以下,细胞内蛋白质变化幅度不大,一直处于 30.4%~36.4%。

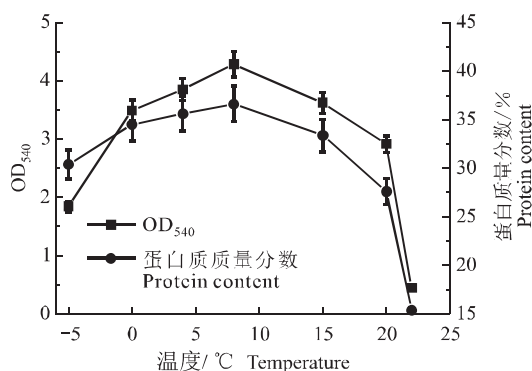


图1 温度对海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 生长和蛋白质含量的影响

Fig.1 Effects of temperature on the cell growth and the protein content from the sea ice bacterium *Colwellia* sp. NJ341

2.2 不同温度下南极海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 脂肪酸含量

3 个温度下海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 脂肪酸组分含量见表 1。从表 1 的脂肪酸归一化分析结果可以得出,培养温度对海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 脂肪酸成分含量有影响。随着培养温度降低,菌体 C_{16:1ω9} 脂肪酸的含量显著提高,其相对含量从 21.85% 上升到 31.78% ($P > 0.05$); C_{16:1ω7} 脂肪酸也从 18.26% 上升到 20.66% ($P > 0.05$)。另外

支链脂肪酸 $C_{15:0}$ 和 $C_{16:0}$ 含量略有上升,但没有达到显著水平。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下支链脂肪酸总含量从 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 8.15% 上升到 12.18% ; 饱和脂肪酸总含量从 66.11% 上升到 68.41% 。但是 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $C_{18:1}$ 不饱和脂肪酸含量从 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 26.00% 下降到 15.97% 。

表 1 不同温度下海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 细胞脂肪酸含量

Tab.1 Whole cell fatty acid profiles of sea ice bacterium *Colwellia* sp. NJ341 cell grown under different temperatures %

脂肪酸 Fatty acid	$0\text{ }^{\circ}\text{C}$	$8\text{ }^{\circ}\text{C}$	$15\text{ }^{\circ}\text{C}$
$C_9:0$	0.33	0.39	0.38
$C_{10:0}$	0.79	0.69	0.56
$C_{11:0}$	0.32	0.34	0.61
$C_{12:0}$	0.47	0.42	0.39
$C_{13:0}$	0.37	0.49	0.63
$C_{15:0}$	3.65	3.28	2.06
$C_{16:1\omega7}$	20.66	19.16	18.26
$C_{16:1\omega9}$	31.78	26.85	21.85
$C_{16:0}$	8.53	8.48	6.09
$C_{17:0}$	1.47	2.46	3.17
$C_{18:1\omega9}$	15.97	21.73	26.00
i	12.18	11.76	8.15
ω	68.41	67.74	66.11

2.3 不同温度下南极海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 GST 活力和 MDA 含量

不同温度下海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 中 GST 活力如图 2 所示。可以看出,海冰细菌 NJ341 在 $8\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度范围内没有检测到 GST 活力。随着培养温度下降到 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, GST 活力为 23.6 U , $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时为 86.4 U ; $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最高,为 90.6 U 。不同培养温度条件下海冰细菌 NJ341 中 MDA 含量的变化见图 3。可以看出,海冰细菌 NJ341 在 $8\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长 MDA 含量基本不发生变化,介于 $0.039\sim 0.053\text{ nmol/L}$ 之间。随着培养温度下降到 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, MDA 含量明显上升至 0.58 nmol/L ($P<0.01$),而后变化幅度不大,介于 $0.58\sim 0.64\text{ nmol/L}$ 之间。

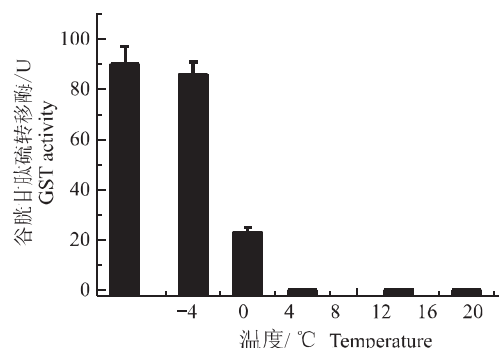


图 2 不同温度下海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 谷胱甘肽硫转移酶活力

Fig.2 GST activity of sea ice bacterium *Colwellia* sp. NJ341 under different temperatures

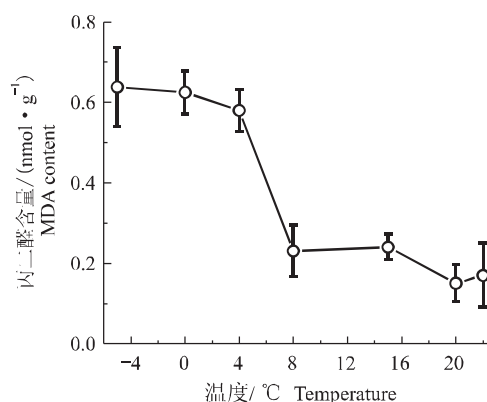


图 3 不同温度下对海冰细菌 *Colwellia* sp. NJ341 MDA 的含量

Fig.3 MDA content of sea ice bacterium *Colwellia* sp. NJ341 under different temperatures

3 讨论

微生物生长在极端低温下,具有一系列复杂、完整的化学反应代谢机制,需要调整一些调节蛋白和代谢关键酶等细胞内蛋白的含量来适应生长温度的降低^[11]。本研究结果表明,当培养温度为 $0\sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,海冰细菌 NJ341 细胞内蛋白质含量保持在较高的水平(图 1)。这说明海冰细菌 NJ341 在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或更低温度下具有合成蛋白质的能力,这可能与核糖体、酶类以及细胞中的可溶性因子等对低温的适应有关^[12]。温度的改变可以直接影响微生物生长速率、酶的活力、细胞组分和营养成分的吸收;间接地影响细胞内分子的溶性、离子运输与转移、膜透性、表面张力,甚至膜脂结构的改变^[6]。低温会导致细

菌细胞质膜上脂肪酸链更紧密的排列,使脂双层凝胶化,从而限制分子的运动,影响膜的功能^[13]。本研究发现,0℃培养时海冰细菌 NJ341 细胞中不饱和脂肪酸 C_{16:1ω9} 和 C_{16:1ω7} 含量比 15℃培养时显著增加。不饱和脂肪酸含量的增加,会引起脂类溶化点的降低,从而使膜中脂类处于液态和流动态,这与前人对其他海冰细菌的低温适应性研究相似^[11]。除了不饱和脂肪酸的改变以外,尚有其他变化如缩短酰基链的长度、增加脂肪酸支链的比例和减少环状脂肪酸的比例等^[13]。本实验结果表明,在 0℃培养同 15℃培养时相比,海冰细菌 NJ341 细胞中两种支链脂肪酸 C_{15:0} 和 C_{16:0} 含量略有上升,但没有达到显著水平。本研究还发现,细胞内不饱和脂肪酸 C_{16:1ω9} 和 C_{16:1ω7} 含量增加的同时, C_{18:1} 不饱和脂肪酸含量从 26.00% 下降到 15.97%。这种不饱和脂肪酸碳链变短将更有利于降低熔点温度,从而有利于低温下膜的流动性^[13]。

丙二醛是硫代巴比妥酸的主要代谢产物,能够反映有毒活性氧的变化,是脂质过氧化的重要标志^[14]。在本研究中,当培养温度下降到 4℃ 时,MDA 含量明显上升 ($P < 0.01$),而温度继续下降其变化幅度不大(图 3)。这一结果表明,海冰细菌 NJ341 在 0℃ 新陈代谢过程中产生一定量的活性氧,活性氧的产生会在一定程度上破坏脂质的功能。在正常情况下,细胞中活性氧的产生和抗氧化酶系统的活性是平衡的,谷胱甘肽硫转移酶催化氧化应激引起脂质过氧化损伤产生的各种毒性代谢产物(如羟烯醛等)与谷胱甘肽(GSH)的巯基共价结合,并且促使它们以非酶的方式排出体外^[15],从而防止脂质过氧化损伤扩大、抵御及修复 DNA 的损伤等。在研究 *E. coli* 时发现,谷胱甘肽相关酶类,如谷胱甘肽硫转移酶与其他抗氧化酶 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPX)等,在组织中协调表达多种抗氧化防御来保护自己^[16]。这些结果暗示,海冰细菌 NJ341 生长在 0℃ 下,引起细胞发生氧化应激反应,而该温度下谷胱甘肽硫转移酶在表达水平上得到增强(图 2),可以排除由于这种氧化应激反应所引起脂质过氧化损伤产生的各种毒性代谢产物,这是南极海冰细菌 NJ341 对极端低温环境的一种重要的适应机制。这种低温适应机制仅在耐冷植物低温适应性的研究中发现^[17]。这一研究可为南极微生物的极端环境分子适应机理研究和深入开发极端微生物资源提供科学依据。

参考文献:

- [1] Mock T, Thomas D N. Recent advances in sea ice microbiology [J]. *Environ Microbiol*, 2005, 7 (5): 605 – 619.
- [2] Zeng R, Zhang R, Zhao J, et al. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: Enzyme purification and characterization [J]. *Extremophiles*, 2003, 7: 335 – 337.
- [3] 俞勇, 李会荣, 陈波, 等. 低温脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其部分酶学性质 [J]. *高技术通讯*, 2003, 10: 89 – 93.
- [4] Wang Q F, Miao J L, Hou Y H, et al. Expression of CspA and GST by an Antarctic psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 at near-freezing temperature [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, 22: 311 – 316.
- [5] 王全富, 缪锦来, 李光友, 等. 南极微生物低温蛋白酶菌株的筛选、鉴定及部分酶活特性. *中国水产科学*, 2005, 12 (4): 437 – 444.
- [6] Chintalapati S, Kiran M D, Shivji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation [J]. *Cell Mol Biol*, 2004, 50 (5): 631 – 642.
- [7] Bakermans C, Nealson K H. Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopetella* [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186 (8): 2 340 – 2 345.
- [8] White D C, Davis W M, Nickels J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate [J]. *Oecologia*, 1979, 40: 51 – 62.
- [9] Warholm M, Guthenberg C, Von Bahr C, et al. Glutathione transferases from human liver [J]. *Methods Enzymol*, 1985, 113: 499 – 504.
- [10] Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. *J Exp Bot*, 1981, 32: 93 – 101.
- [11] Phadtare S. Recent developments in bacterial cold-shock response [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6: 125 – 136.
- [12] Jones P G, Cashel M, Glaser G, et al. Function of a relaxed – like state following temperature downshifts in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174: 3 903 – 3 914.
- [13] Russell NJ, Nichols DS. Polyunsaturated fatty acids in the bacteria – a dogma rewritten [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 767 – 779.
- [14] 王爱国. 丙二醛作为脂质过氧化指标的探讨 [J]. *植物生理学通讯*, 1986, 2: 55 – 57.
- [15] Kim S G, Kim E J. Expression of cytochrome P-450s and glutathione S-transferase in the rat liver during water deprivation: effects of glucose supplementation [J]. *J Appl Toxicol*, 2001, 21 (2): 123 – 129.
- [16] Penninckx M J, Elskens M T. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms [J]. *Adv Microbial Physiol*, 1993, 34: 239 – 301.
- [17] Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, et al. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in Cereals [J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 301 – 306.

Preliminary study on low-temperature adaptation of Antarctic sea ice bacterium *Colwellia* sp.

WANG Quan-fu¹, HOU Yan-hua¹, MIAO Jin-lai², XU Zhong¹, KAN Guang-feng¹, LI Guang-you², SHEN Ji-hong²

(1. Harbin Institute of Technology, School of the Ocean, Weihai 264209, China; 2. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract: Antarctic psychrophilic bacterium can survive and thrive in channels or pores at low temperature and high salinity water in Antarctic ice layer. In this study, Antarctic sea ice bacterium *Colwellia* sp. NJ341, isolated from Antarctic sea ice samples collected in 18th Chinese Antarctic expedition during 2001 – 2002, was used as study material. The protein, enzyme, cell fatty acid contents of *Colwellia* sp. NJ341 growing at different temperatures were analyzed, and the results showed that the extent of growth and protein content kept high level at 0 °C. *Colwellia* sp. NJ341 growing at 0 °C exhibited higher growth rate and protein content compared with those at 15 °C, with notably increased unsaturated fatty acid such as C16:1 ω 9 and C16:1 ω 7 ($P < 0.05$), but unsaturated fatty acid C18:1 notably decreased ($P < 0.05$). Malondialdehyde determination (MDA) as index of lipid peroxide notably increased at 4 °C ($P < 0.01$), but its content kept steady at temperatures ranging from 4 °C to -5 °C. However, we found that GST activity was not detected at temperatures ranging from 8 °C to 22 °C, while MDA content notably increased at temperatures ranging from 4 °C to -5 °C. These changes of important physiological parameters would offer significant information to understand the microbial low-temperature adaptation mechanism at near-freezing temperatures. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 1 027 – 1 031]

Key words: *Colwellia* sp.; low-temperature adaptation; Antarctic; sea ice bacterium

Corresponding author: WANG Quan-fu. E-mail: wangquanfu2000@126.com

书讯

《鱼类精子和胚胎冷冻保存的理论与技术》一书出版

由黄海水产研究所陈松林研究员主著的《鱼类精子和胚胎冷冻保存的理论与技术》一书 2007 年 6 月由中国农业出版社出版。本书是我国水产动物种质低温保存领域的第一部专著,全面系统地介绍了鱼类低温生物学理论、鱼类精子和胚胎生理特性、冷冻保存原理和技术方法以及鱼类冷冻精子库建立、维持和应用等技术内容,特别是详细介绍了我国 20 多种重要养殖鱼类精子冷冻保存的具体方法。该书的特点是既有理论上的阐述,又有具体的技术方法,学术性强、实用性强、可操作性也强,既适合从事水产低温生物学和冷冻保存研究和教学、水产种植资源保存、遗传育种和水产养殖的科技人员阅读,又适合鱼类养殖场的技术人员和工人阅读。参考这本专著,就可以进行鱼类精子冷冻保存的研究和应用。该书共 67 万字,精装,配有彩图,定价为 86 元。

联系地址: 山东省青岛市南京路 106 号,中国水产科学研究院黄海水产研究所,邮编:266071

联系人: 田永胜博士,陈松林研究员

联系电话: 0532-85844606; **传真:** 0532-85811514

E-mail: tianys@ysfri.ac.cn; chensl@ysfri.ac.cn