

电场对黄孢原毛平革菌生长、细胞通透性及其胞外酶反应的影响

王福远¹, 苗长春², 韩慧龙¹, 金文标², 刘铮¹

(1. 清华大学化工系, 北京 100084; 2. 哈尔滨工业大学深圳研究生院, 广东 深圳 518055)

摘要: 研究了交、直流电场对黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的生长、细胞通透性及其所分泌的漆酶、木质素过氧化物酶及锰型过氧化物酶活力的影响. 结果表明, 施加 50 Hz, 50 mA 交流电可显著地促进 *Phanerochaete chrysosporium* 的生长, 经过 10 d 的培养, 其干菌重为对照组的 1.72 倍; 施加交、直流电都能够使细胞的通透性增强; 施加交、直流电场在短时间内可显著提高 3 种胞外酶的活力, 而时间过长则导致活力降低, 电流强度为 10 mA 时的适宜加电时间为 10 h.

关键词: 电刺激; 黄孢原毛平革菌; 漆酶; 木质素过氧化物酶; 锰型过氧化物酶

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)02-0385-05

1 前言

在污水处理或污染土壤修复的生物反应体系中, 施加电场可以提高污染物的降解速率^[1,2]. She 等^[3]以细菌 *Enterobacter dissolvens* 为研究对象, 考察了外加电场下 *E. dissolvens* 菌在活性、生长、底物代谢等诸方面所受影响. 结果表明, 以电解水反应为主的电极反应可显著提高 *E. dissolvens* 菌的生长速率和代谢活性. 该研究为电场强化的生物修复技术提供了基础.

本研究考察真菌在电场作用下的细胞生长、细胞通透性和胞外酶活的变化. 所研究的真菌为黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*, 它属于白腐真菌, 能够产生丰富的胞外木质素降解酶系如漆酶(Laccase)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase)和锰型过氧化物酶(Manganese peroxidase)等^[4]. 该酶系对多环芳烃类污染物具有很强的降解能力, 在石油烃和多环芳烃污染土壤的修复中具有广泛的应用^[5-8]. 考察了施加交、直流电场的情况下, *Phanerochaete chrysosporium* 的细胞生长、细胞通透性和胞外酶反应的变化, 为电场强化的土壤生物修复技术开发及应用提供基础.

2 材料和方法

2.1 微生物

Phanerochaete chrysosporium (CGMCC 5.0776)来源于中国普通微生物保存中心.

2.2 培养方法

培养基在 121 °C 高压灭菌处理 15 min. 菌种的固体培养基为马铃薯琼脂培养基, 液体培养基为限氮型培养基^[9], 培养温度为 30 °C. 真菌接种到装有 100 mL 液体

培养基的 250 mL 摇瓶中, 80 r/min, 30 °C 培养. 孢子悬浮液接种量为 5 mL (调整 OD₆₅₀=0.5, 经血球计数, 孢子数约 10⁷ 个/mL).

2.3 电刺激实验

在图 1 所示的电刺激培养装置中进行电刺激实验, 摇瓶容积 250 mL, 铂金电极直径 0.3 mm, 电极间距 5 cm, 电极浸入液面下 2 cm. 施加电场为非均匀电场. 实验在经过灭菌的液体培养基中进行.

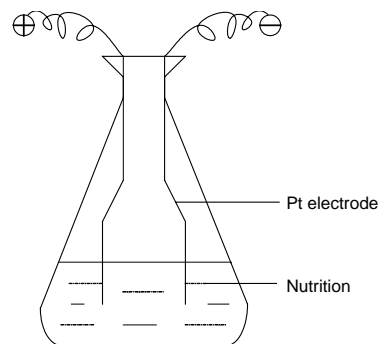


图 1 电刺激培养装置示意图
Fig.1 Schematic view of the electro-stimulating apparatus for fungi cultivation

2.4 分析检测

2.4.1 真菌生物量的检测

进行培养真菌平行实验. 检测真菌生物量时, 将中性滤纸干燥后称重. 每次检测将整瓶培养液过滤, 把滤纸和残留的真菌菌体在 105 °C 下干燥 8 h 后, 在干燥器中冷却至室温, 使用 1/10000 g 电子天平称重, 得到真菌菌体干重.

2.4.2 细胞通透性检测

收稿日期: 2006-05-09, 修回日期: 2006-09-15

作者简介: 王福远(1980-), 男, 山东省济宁市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 刘铮, 通讯联系人, Tel: 010-62779876, E-mail: liuzheng@mail.tsinghua.edu.cn.

以 $M_w=38200$ 的异硫氢酸荧光素-右旋糖苷 (FITC-Dextran, Sigma) 为荧光大分子底物, 分析菌液荧光强度的变化. 真菌培养 6 d 后开始实验. FITC-Dextran 在菌液中的初始浓度为 25 mg/L, 避光培养, 1 h 后开始取样. 每次取 2 mL 培养液, 经 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1.5 mL, 使用荧光分光光度计 (F-4500, Hitachi) 检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm.

2.4.3 酶活检测

培养 6 d 后开始施加电场. 所有样品在检测前都进行离心 (10000 r/min) 处理 10 min, 取 0.2 mL 离心过的粗酶液, 加入到 0.8 mL 测定溶液中, 酶活检测使用分光光度法. 测定波长分别为: 漆酶 590 nm, 木质素过氧化物酶 310 nm, 锰型过氧化物酶 420 nm.

漆酶酶活测定溶液: pH 4.5, 0.1 mol/L 酒石酸钠缓冲溶液, 含 5 mmol/L 2,2-azinobis(3-ethylbenzo-thiazoline-

6-fulfonic acid) (ABTS) 和 0.1 mol/L 乳酸.

木质素过氧化物酶测定溶液: pH 3.0, 0.1 mol/L 酒石酸钠缓冲溶液, 含 0.4 mmol/L 的藜芦醇 (Veratryl alcohol), 引发剂为 54 mmol/L 的 H_2O_2 6 μ L.

锰型过氧化物酶测定溶液: pH 4.0, 0.1 mol/L 琥珀酸钠缓冲液配制 100 μ mol/L 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH), 含 5 mmol/L 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB), 0.2 mmol/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 反应时加入 54 mmol/L 的 H_2O_2 6 μ L 作为引发剂.

3 结果与讨论

3.1 交、直流电场对 *P. chrysosporium* 生长的影响

分别施加不同电流强度的交流和直流电场, 定期取样, 测定其中的真菌干重, 实验结果如图 2 所示.

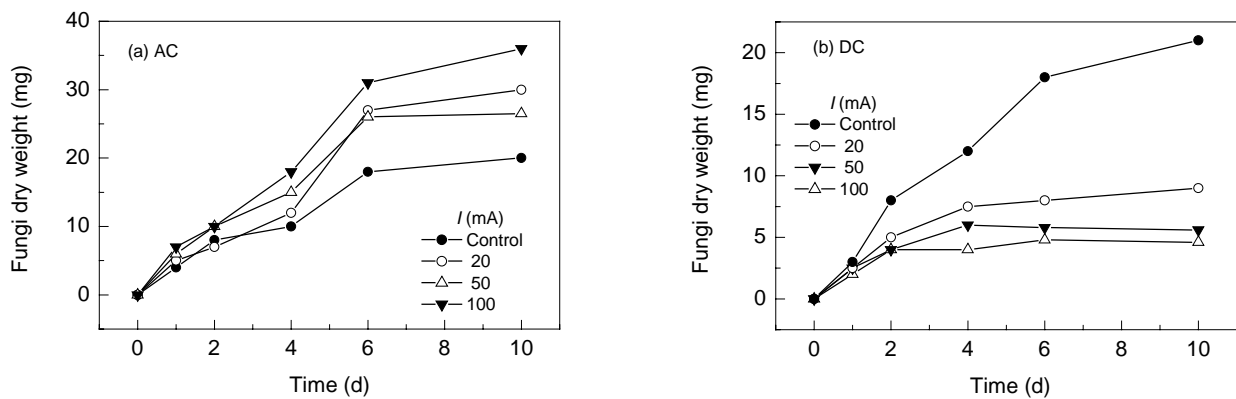


图 2 电场对黄孢原毛平革菌生物量的影响

Fig.2 Effect of electric field on biomass production of *Phanerochaete chrysosporium*

从图 2(a)可知, 施加交流电场显著地提高了菌生物量, 其中电流强度为 50 mA 时的效果最佳, 经过 10 d 培养, 真菌干重为对照组的 1.72 倍. 而从图 2(b)可知, 直流电场下的真菌干重低于对照组, 而且电流强度越高, 与对照组的差距越大. 在 100 mA 直流电场下, 经过 10 d 培养后的真菌干重仅为对照组的 1/5. 类似的现象也出现在细菌 *Enterobacter dissolvens* 体系中, 该体系中长时间施加直流电场导致培养基溶液酸化以及细胞穿孔是生物量降低的主要原因^[10].

3.2 电场电解刺激对细胞通透性的影响

真菌的细胞膜包括 3 种组分: 质膜、外周质膜空间和细胞壁, 其中细胞壁具有明显的多孔性. 细胞壁主要由等量的葡聚糖 (Glucan)、几丁质 (Chitin) 和甘露糖蛋白 (Mannoprotein) 组成. 葡聚糖组成了细胞壁的微纤维网络, 提供了细胞壁的刚性. 甘露糖蛋白能够共价连接到葡聚糖上, 在膜的最外层形成了无定性层, 通过二硫键

决定细胞壁的多孔性. 葡聚糖侧链和甘露糖蛋白氢键与离子相互作用, 加强了细胞壁的完整性和稳定性^[11].

在微生物体系中, 施加电场往往会导致细胞通透性的变化, 甚至造成细胞壁和细胞膜的损伤及胞内蛋白的泄漏, 这是导致其生长和代谢特性变化的重要因素^[12,13]. 为此, 采用 FITC-Dextran 作为荧光大分子物质, 通过真菌对荧光大分子物质的吸收以检测细胞的通透性. 通过测定 FITC-Dextran 在菌液中荧光强度的变化来考察电场对于细胞通透性的影响, 实验结果如图 3 所示.

从图 3(a)可知, 在交流电场下, 当电流强度为 20 和 50 mA 时, 6 h 后, 细胞荧光强度开始低于对照组, 18 h 后降至对照组的约 80% 和 70%, 而 100 mA 的电流强度下, 细胞荧光强度 1 h 后即低于对照组, 18 h 后降至对照组的 38%.

从图 3(b)可知, 施加 10 mA 的直流电场时, 细胞荧光强度在 10 h 后才开始下降, 18 h 后降至对照组的

74%; 而在 20 和 100 mA 电流下, 荧光强度持续变化, 18 h 后分别降为对照组的 60% 和 3%.

上述结果表明, 无论施加交流还是直流电场, 均导

致细胞对 FITC-Dextran 的摄取率提高, 表明施加电场导致 *Phanerochaete chrysosporium* 细胞通透性增加, 原因还需要进一步深入研究.

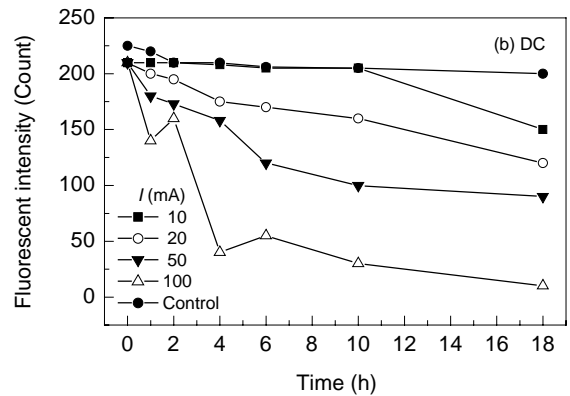
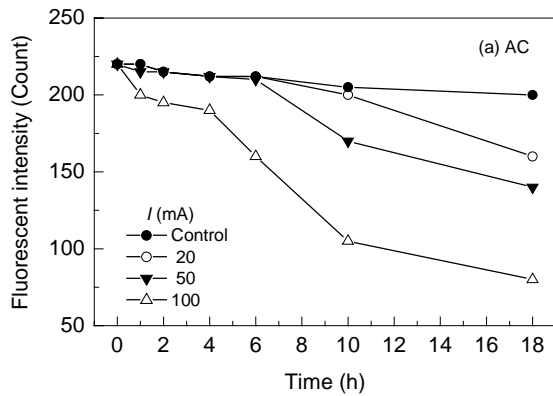


图 3 电场对黄孢原毛平革菌细胞通透性的影响

Fig.3. Effect of electric field on cell membrane permeability of *Phanerochaete chrysosporium*

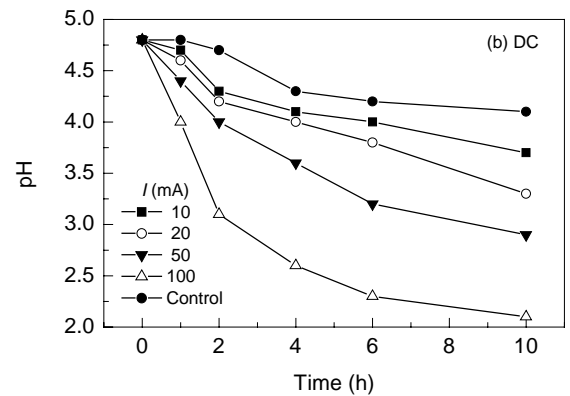
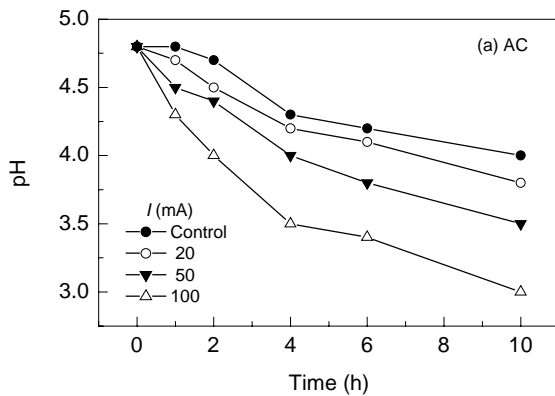


图 4 电场对培养基 pH 值的影响

Fig.4 Effect of electric field on pH of culture medium

3.3 电场对培养液 pH 的影响

在微生物体系中施加电场还有可能导致培养体系 pH 发生变化, 影响其生长和代谢行为. 为此, 考察了在培养体系中分别施加不同电流强度的交流电和直流电后, 培养体系 pH 的变化结果如图 4 所示.

从图 4 可知, 施加交流和直流电场均导致培养体系 pH 下降, 且电流强度越高, pH 降低幅度越大. 施加 100 mA 交流电场 10 d 后, 培养体系的 pH 从最初的 4.8 降低到 3.0, 而施加 100 mA 直流电场 10 d 后则使培养体系的 pH 值降低至 2.0. 培养体系 pH 值降低主要是由于水电解反应使体系中 H^+ 浓度提高所致. 而交流电场中由于 H^+ 能够部分地被同一电极所产生的 OH^- 所中和, 故体系 pH 降低幅度低于直流电场. 综上所述, 施加电场导致培养体系的 pH 值降低, 这会直接影响菌的生长及其胞内代谢和胞外反应, 值得逐一深入研究.

3.4 电场对 *Phanerochaete chrysosporium* 培养体系胞外表观酶活力的影响

分别施加不同强度的交流和直流电场, 定时取样, 测定漆酶、木质素过氧化物酶和锰型过氧化物酶的活性, 结果如图 5 所示.

从图 5(a)可知, 施加电场后, Laccase 酶酶活先提高, 后降低, 其中 10 mA 直流电场的刺激效果最佳, 10 h 后的酶活为对照组的 3.3 倍, 而施加 20 和 50 mA 交流电 10 h 后则酶活仅为对照组的 2.5 和 1.7 倍.

类似的情况也出现在木质素过氧化物酶[图 5(b)]和锰型过氧化物酶[图 5(c)]上, 施加电场后木质素过氧化物酶和锰型过氧化物酶酶活的变化均是先升高而后降低, 最后甚至低于对照组. 施加 10 mA 直流电时酶活提高最显著, 其次是 50 和 20 mA 交流电.

Mester 等^[14]对真菌体系的研究结果显示, 加电初期

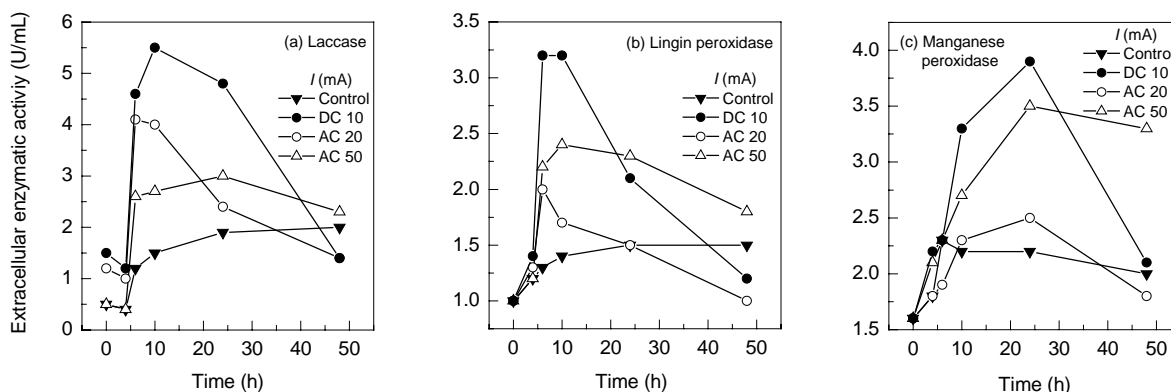


图5 电场对黄孢原毛平革菌胞外酶活性的影响

Fig.5 Effect of electric field on extracellular enzymatic activity of *Phanerochaete chrysosporium*

胞外酶活的增加可能是由于电解过程产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基和 H_2O_2 导致体系的氧化还原电势降低等所致。而细菌体系持续加电会导致培养体系pH降低,菌体表面损伤,由此影响到最终菌体的生长和代谢行为^[3,15,16]。本工作所研究的*Phanerochaete chrysosporium*结果表明,不同类型和不同强度的电场对于细胞的生长及其胞外酶活力的影响是多样的,需要系统地加以研究。

4 结论

考察了不同强度的交、直流电场对*Phanerochaete chrysosporium*的生长、细胞通透性及其胞外酶活力的影响。结果表明,施加交流电可显著促进*Phanerochaete chrysosporium*的生长,在本实验中最佳电流强度为50 mA。施加交、直流电都能使细胞的通透性增强,施加电场也会导致培养体系pH值降低。施加交、直流电场在短时间内可以促进漆酶、木质素过氧化物酶和锰型过氧化物酶酶活的提高。

参考文献:

- [1] Golder A K, Hridaya N, Samanta A N, et al. Electrocoagulation of Methylene Blue and Eosin Yellowish Using Mild Steel Electrodes [J]. J. Hazard. Mater. B, 2005, 127: 134–140.
- [2] Natarajan K A. Effect of Applied Potentials on the Activity and Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Biotechnol. Bioeng., 1992, 39: 907–913.
- [3] She P, Song B, Van Loosdrecht M, et al. Electrolytic Stimulation of Bacteria *Enterobacter dissolvens* by a Direct Current [J]. Biochem. Eng. J., 2006, 28: 23–29.
- [4] Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin [J]. Annual Rev. Microbiol., 1987, 41: 465–505.
- [5] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* Burds [J]. Science, 1984, 221: 661–663.
- [6] Bumpus J A, Tien M, Wright D, et al. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus [J]. Science, 1985, 228: 1432–1436.
- [7] Mester T, Tien M. Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants [J]. Int. Biodeterior. Biodegrad., 2000, 46: 51–59.
- [8] Radha K V, Regupathi I, Arunagiri A, et al. Decolorization Studies of Synthetic Dyes Using *Phanerochaete chrysosporium* and Their Kinetics [J]. Process Biochem., 2005, 40: 3337–3345.
- [9] Bumpus J A, Brock B J. Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54(5): 1143–1150.
- [10] Ohmura N, Matsumoto N, Sasaki K, et al. Electrochemical Regeneration of Fe(III) to Support Growth on Anaerobic Iron Respiration [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 405–407.
- [11] Klis F M, Boorsma A, De Groot P. Cell Wall Construction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2006, 23: 185–202.
- [12] Ganeva V, Galutzov B, Teissie J. Electric Field Mediated Loading of Macromolecules in Intact Yeast Cells Is Critically Controlled at the Wall Level [J]. Biochim. Biophys. Acta: Biomembrane, 1995, 1240(2): 229–236.
- [13] Ramanathan M, Kuo H R, Lambert C W, et al. Introduction of Macromolecules into Synaptosomes Using Electroporation [J]. J. Neurosci. Methods, 2000, 96(1): 19–23.
- [14] Mester T, Tien M. Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants [J]. Int. Biodeterior. Biodegrad., 2000, 46: 51–59.
- [15] Hoshino N, Kimura T, Yamaji A, et al. Damage to the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by Catechin–Copper(II) Complexes [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27: 1245–1250.
- [16] Liu T Z, Lin T F, Chiu D T Y, et al. Palladium or Platinum Exacerbates Hydroxyl Radical Mediated DNA Damage [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23: 155–161.

Effect of Electric Field on Cell Growth, Permeability and Extracellular Enzymatic Reactions of *Phanerochaete chrysosporium*

WANG Fu-yuan¹, MIAO Chang-chun², HAN Hui-long¹, JIN Wen-biao², LIU Zheng¹

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Shenzhen Graduate School, Harbin Institute of Technology, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: The effect of electric field on the cell growth and permeability of *Phanerochaete chrysosporium*, and extracellular enzymatic activity of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase, squeezed extracellularly out of *Phanerochaete chrysosporium*, was experimentally investigated, respectively. The application of 50 Hz alternating current of 50 mA enhanced the growth of *Phanerochaete chrysosporium*, giving a 1.72 fold increase in cell dry weight after 10 d culture. The cell permeability was also increased when exposed to either DC or AC. The enzymatic activity of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase was firstly increased and then reduced when exposed to DC, and the suitable operation time was 10 h for DC of 10 mA.

Key words: electrostimulation; *Phanerochaete chrysosporium*; laccase; lignin peroxidase; manganese peroxidase