

营养启动剂诱导类炭疽芽胞发芽的研究

张利军 熊鸿燕 张耀 马非 李莉

【摘要】 目的 观察营养启动剂诱导类炭疽芽胞杆菌芽胞发芽的生物效应。方法 通过热激活和营养启动剂诱导类炭疽芽胞发芽;分光光度计测量芽胞悬液在600 nm的吸光度值(A),计算不同条件下的发芽率;透射电镜观察发芽过程中芽胞超微结构的变化。结果 在37℃ pH 7.9的条件下,6 mmol/L次黄嘌呤核苷营养诱导剂使类炭疽芽胞发芽率为68.0%;在30℃ pH 8.9的条件下,70 mmol/L L-丙氨酸营养诱导剂使类炭疽芽胞发芽率为74.5%;两者的混合营养诱导剂可明显提高发芽率,达到85.6%;透射电镜下观察,见类炭疽芽胞出现外衣及皮质层破裂、降解,核心暴露。结论 在人工调整的适宜环境下,以次黄嘌呤核苷和L-丙氨酸为主要成分的营养启动剂可快速启动类炭疽芽胞发芽。

【关键词】 类炭疽芽胞;发芽;营养启动剂

Studies on the germination of *Bacillus anthracoides* spores induced by nutrient germinant ZHANG Li-jun, XIONG Hong-yan, ZHANG Yao, MA Fei, LI Li. Department of Military Epidemiology, Academy of Preventive Medicine, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Corresponding author: XIONG Hong-yan, Email: hyxiong@mail.tmmu.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the germination effects of *Bacillus anthracoides* spores germinant to nutrient germinant. **Methods** Heat factors and nutrient germinant were used to stimulate the *Bacillus anthracoides* spores and to germinate. Ultraviolet spectrophotometer was used to measured the A value of spore solution in the wavelength of 600 nm. According to the A value, the germination rates in different condition. Transmission electron microscope was used to observe the ultrastructure changes of spores. **Results** The rate of germination effects were 68.0% under 6 mmol/L inosine at 37℃, pH 7.9; 74.5% under 70 mmol/L L-alanine at 30℃, pH 8.9; and 85.6% under 6 mmol/L inosine and 70 mmol/L L-alanine at 37℃, pH 8.2. Under transmission electron microscope, the germinated spores' coat and cortex were broken down and degraded with its core completely exposed. **Conclusion** Under suitable environment, the nutrient germinant with inosine and L-alanine might be helpful for germinating the bacillus anthracoides spores.

【Key words】 *Bacillus anthracoides*, spore; Germination; Nutrient germinant

炭疽芽胞抵抗力强,对热力、干燥、辐射、化学消毒剂等理化因素均有很高的抗力。当受到炭疽芽胞攻击时,被污染环境中的芽胞很难彻底清除,并对人群造成持续的威胁。目前,常规的处理方法是对疫源地进行长时间封锁,或者进行大面积、高剂量和高强度的消毒处理^[1]。这种措施不能达到及时净化环境的效果,而且对环境也将造成再次严重的化学污染,破坏环境的生态平衡。如果能采用人工诱导的方法,快速、有效地启动芽胞发芽,将有利于进一步

采用温和的化学消毒技术和噬菌体溶菌技术进行杀菌处理,使在有效清除芽胞的同时,避免环境的再次严重污染。为此,我们以类炭疽杆菌为试验菌,进行了利用营养启动剂诱导芽胞发芽的研究。

材料与方法

1. 菌株:实验所用类炭疽芽胞杆菌(80-08)由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供,该菌株从土壤中分离所得,其生物特性和抗力与炭疽杆菌相似^[2]。

2. 芽胞悬液制备:根据中华人民共和国卫生部消毒技术规范制备^[3]。

3. 营养启动剂诱导芽胞发芽^[4]:

基金项目:全军“十五”科技基金资助项目(01MA170)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学预防医学院流行病学教研室

通讯作者:熊鸿燕,Email:hyxiong@mail.tmmu.com.cn

(1)芽胞热激活反应:用无菌蒸馏水将芽胞悬液稀释成 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml(以活菌计数为准),在 70°C 恒温水浴箱水浴30 min,然后置于冰上5 min。

(2)营养启动剂诱导发芽:

①次黄嘌呤核苷启动剂:芽胞液用10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),10 mmol/L NaCl 混悬液适当稀释,加入次黄嘌呤核苷,使次黄嘌呤核苷终浓度为6 mmol/L。在 37°C 下作用20 min、40 min、60 min、80 min和100 min,分别取芽胞悬液样本。同时设立试验对照组:芽胞液用10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),10 mmol/L NaCl 混悬液适当稀释,不加次黄嘌呤核苷。芽胞发芽后,其外层的壳体及皮质发生破裂和降解,悬液对600 nm吸光度下降。采用分光光度计(UV-9200型紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司)检测悬液600 nm波长下的吸光度(A)值,计算发芽率^[4]。

$$\text{发芽率} = \frac{\text{试验对照组 A 值} - \text{试验组 A 值}}{\text{试验对照组 A 值}}$$

②L-丙氨酸启动剂:芽胞液用50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.9),50 mmol/L NH_4Cl 混悬液适当稀释,加入L-丙氨酸,使L-丙氨酸终浓度为70 mmol/L,再加入O-氨基酰基-D-丝氨酸(终浓度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以消除芽胞的丙氨酸消旋酶抑制L-丙氨酸诱导发芽作用。在 30°C 下作用一定时间,取芽胞悬液样本。同时设立试验对照组:用50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.9),50 mmol/L NH_4Cl 适当稀释芽胞液,不加L-丙氨酸。按照上述方法进行发芽率检测。

③AGFK 启动剂:AGFK 发芽剂主要成分由L-天冬酰胺酸、D-葡萄糖、D-果糖溶液及磷酸盐组成。芽胞悬液用10 mmol/L L-天冬酰胺酸、10 mmol/L D-葡萄糖、10 mmol/L D-果糖、50 mmol/L磷酸盐混合液(pH 7.0)稀释。在 37°C 下作用一定时间,取芽胞悬液样本;同时设立试验对照组,芽胞悬液用50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释,按照上述方法进行发芽率检测。

④混合启动剂:用10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2),10 mmol/L NaCl 与芽胞悬液适量混合,加入次黄嘌呤核苷和L-丙氨酸,使终浓度分别为6 mmol/L和70 mmol/L;在 37°C 下作用一定时间,取芽胞悬液样本;同时设立试验对照组,芽胞悬液用10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2),10 mmol/L NaCl 混合液稀释,不加次黄嘌呤核苷和L-丙氨酸;按照上述

方法进行发芽率检测。上述各试验重复三次。以上试剂次黄嘌呤核苷、L-丙氨酸、L-天冬酰胺酸、D-葡萄糖、D-果糖及磷酸盐及O-氨基酰基-D-丝氨酸由华美生物工程公司提供。

4. 营养启动剂最佳作用条件观察:分别以次黄嘌呤核苷启动剂、L-丙氨酸启动剂和混合启动剂为诱导发芽试验组,再分别变动各组营养启动剂的浓度、反应环境(pH 及温度),在作用20 min后取反应悬液,并进行发芽率计算。试验重复三次。

5. 透射电镜观察:芽胞经热效应激活后,经次黄嘌呤核苷启动剂作用(次黄嘌呤核苷终浓度6 mmol/L,作用温度 37°C ,pH 7.9)20 min,取反应样本液进行负染色:将一滴(20 μl 左右)芽胞悬液样品滴在覆有膜的载网上,再滴一滴pH 7.0的2%磷钨酸(PTA)溶液,1-2 min后用滤纸吸除多余液体,在空气中干燥,然后在透射电镜(荷兰飞利浦TECNAI10型)下观察并照相。制作电镜样本3~4份,观察时,每个样本观察20~30个视野。以同样方法制作正常芽胞悬液电镜样本(工作电压80 kV)。

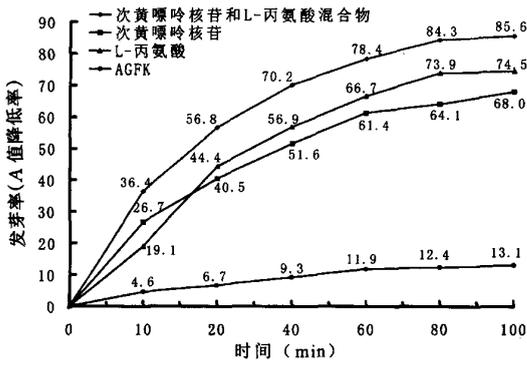
结 果

1. 不同营养启动剂的诱导发芽效应比较:从图1可见,次黄嘌呤核苷和L-丙氨酸单独作为启动剂都能很好启动类炭疽芽胞发芽,在作用时间为100 min时,诱导发芽率可分别达到68.0%和74.5%;两者的混合悬液可进一步增加发芽诱导率,使诱导发芽率达到85.6%;AGFK对类炭疽芽胞的诱导发芽作用最小,发芽率低于20%。

2. 不同反应条件对营养启动剂诱导效应的影响:从图2、3可见,营养启动剂在不同诱导反应环境下,其诱导发芽率有明显的变化。次黄嘌呤核苷诱导发芽的最佳温度和pH值分别为 37°C 和7.9;L-丙氨酸诱导发芽的最佳温度和pH值分别是 30°C 和8.9。两者混合液诱导发芽的最佳温度和pH值为 37°C 和8.2。

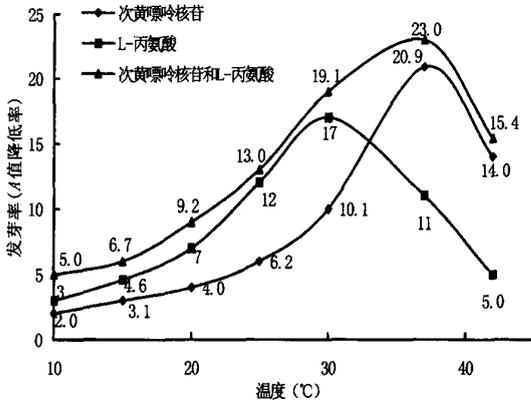
3. 不同浓度营养启动剂对发芽率的影响:从图4、5可见,在单一成分的营养诱导剂作用下,在最佳温度和pH环境中,营养诱导剂的浓度能显著影响发芽的效率。次黄嘌呤核苷的最佳浓度为6 mmol/L左右,L-丙氨酸最佳浓度为70 mmol/L左右。

4. 发芽过程中芽胞的超微结构变化观察:从图6可见,在次黄嘌呤核苷类营养诱导剂作用20 min



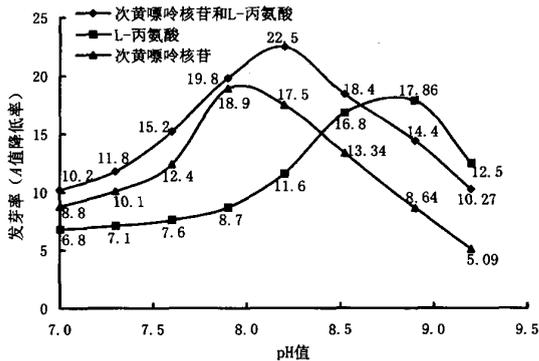
注:次黄嘌呤核苷诱导剂:次黄嘌呤核苷终浓度 6 mmol/L,反应温度 37℃,pH 7.9;L-丙氨酸诱导剂:L-丙氨酸终浓度 70 mmol/L,反应温度 30℃,pH 8.9;AGFK 诱导剂:AGFK 终浓度 10 mmol/L L-天冬酰胺酸, 10 mmol/L D-葡萄糖, 10 mmol/L D-果糖溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,反应温度 37℃,pH 7.0;混合诱导剂:次黄嘌呤核苷终浓度 6 mmol/L, L-丙氨酸终浓度 70 mmol/L,反应温度 37℃,pH 8.2

图1 不同类型营养启动剂诱导类炭疽发芽效果



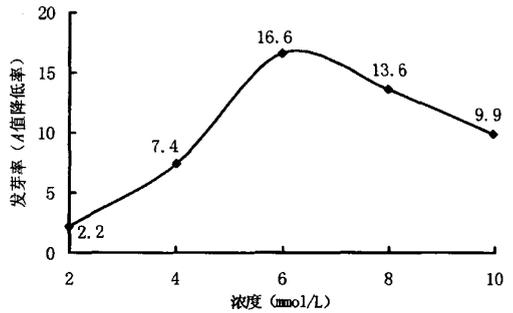
注:次黄嘌呤核苷启动剂:次黄嘌呤核苷终浓度 6 mmol/L,pH 7.9;L-丙氨酸启动剂:L-丙氨酸终浓度 70 mmol/L,pH 8.9;混合启动剂:次黄嘌呤核苷终浓度 6 mmol/L,L-丙氨酸终浓度 70 mmol/L,pH 8.2

图2 温度对营养启动剂诱导芽胞发芽的影响



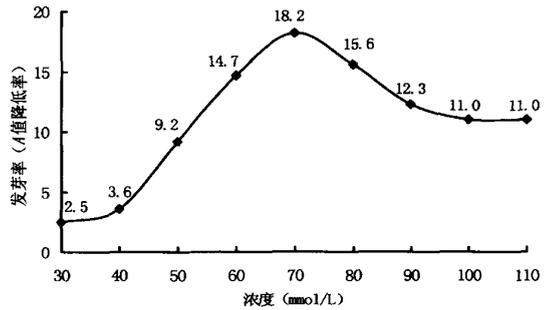
注:次黄嘌呤核苷(6 mmol/L、37℃)、L-丙氨酸(70 mmol/L、30℃)、次黄嘌呤核苷(6 mmol/L)和L-丙氨酸(70 mmol/L)混合物 37℃作用20 min

图3 pH对营养启动剂诱导芽胞发芽的影响



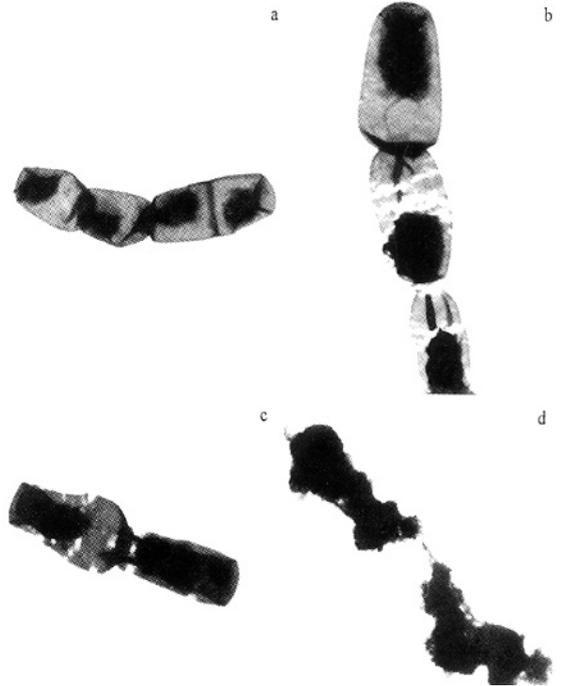
注:反应条件为 37℃,pH 7.9

图4 不同浓度次黄嘌呤核苷发芽结果



注:反应条件为 30℃,pH 8.9

图5 不同浓度L-丙氨酸诱导类炭疽芽胞发芽结果



a:正常类炭疽芽胞:椭圆形、结构清晰,有典型的核、皮质和芽胞外衣结构(TEM×7000); b、c:发芽芽胞:部分外衣及皮质破裂(TEM×10 000); d:发芽芽胞:外衣及皮质完全降解,核心暴露(TEM×17 000)

图6 类炭疽芽胞发芽过程的电镜图

时,被启动发芽的芽胞形态出现外衣及皮质破裂现象,其中部分芽胞的外衣及皮质完全被降解,核心暴露。

讨 论

在营养丰富的条件下,芽胞通过特殊的受体识别营养启动剂,结合后即能激活自溶酶,使皮质的糖肽降解,渗透性增加,核心和皮质中含有的吡啶二羧酸钙与糖钛也逐渐漏出、降解。此时,芽胞快速吸收水分,胞体膨胀,折光率改变,芽胞失去原有的抵抗力。继而芽胞核心体积增大、皮质膨松、胞壳破裂,芽管长出并逐渐长大、新的繁殖体出现。

不同种类的细菌有不同的受体,可与不同的启动剂结合。最新的研究显示,在枯草芽胞杆菌发芽过程中,基因 *gerA* 在 L-丙氨酸单独做为启动剂诱导发芽中起关键作用^[5]。*gerA* 包括三个基因:*gerAA*、*gerAB*、*gerAC*,它们编码的受体蛋白特异性识别 L-丙氨酸;在炭疽芽胞杆菌发芽过程中,基因 *gerS* 在 L-丙氨酸和次黄嘌呤核苷诱炭疽杆菌发芽中起重要作用^[6]。在蜡样芽胞发芽过程中 *gerI* 编码的受体特异性识别次黄嘌呤核苷,其中 *gerIA*、*gerN* 和 *gerP* 基因分别在结合芽胞、控制次黄嘌呤核苷发芽反应中 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{H}^+$ 离子转运和局部影响启动剂对芽胞的渗透性中起作用。*GerI* 还对 L-丙氨酸启动发芽反应起促进作用;而 *gerL* 在 L-丙氨酸启动发芽中起决定性作用。*gerQ* 能特异性作用于次黄嘌呤核苷反应过程,对丙氨酸启动芽胞发芽没有作用^[7-10]。我们的实验结果显示,以次黄嘌呤核苷和 L-丙氨酸为主要成分的诱导剂能快速启动类炭疽芽胞发芽,说明类炭疽芽胞内可能存在相应的受体,分别单独或者“共价”结合次黄嘌呤核苷和 L-丙氨酸。这些受体的生物反应特性及其编码基因是否与其他芽胞相似还有待深入研究。

本研究数据显示,在诱导芽胞发芽过程中,营养启动剂浓度和反应环境因素(温度、pH)的变化可显著影响发芽率。此外,反应环境的离子种类和浓度也会影响发芽效率(结果另文报道)。这些结果提示我们,在实际应用中应当充分考虑环境效应,准确探索高效的反应体系。我们所筛选的最佳发芽条件主要包括次黄嘌呤核苷、L-丙氨酸及两者的混合液三种体系;这些试验结果与 Barlass 等^[11]报道的结果非常一致,给下阶段的研究工作提供了良好的指导作用。

本研究采用分光光度计测定芽胞悬液在 600 nm 波段的吸光度间接计算发芽率。这是一种常规的芽胞发芽测定技术。其原理是利用发芽时芽胞快速吸收水分,胞体膨胀,外衣及皮质破裂、降解等反应导致悬液折光率和吸光度改变的现象。但从电镜观察的资料显示,芽胞的超微结构变化与发芽率的变化不尽一致。如在次黄嘌呤核苷类营养诱导剂作用 20 min 时,发芽率接近 40%,但电镜标本中 80%~90% 的芽胞已出现明显的外衣和皮质的破裂、降解现象。因此,在今后的研究中应当注意选择一些直接的测量指标,进行芽胞发芽的评价。

类炭疽芽胞与炭疽芽胞在形态和抗力特征上非常相近,其一直被作为炭疽菌的替代试验菌^[2,12]。本试验对类炭疽芽胞所开展的人工营养诱导剂发芽研究对进一步开展针对致病性炭疽建立新型的杀灭技术,如噬菌体溶菌,生物酶溶解及低强度理化因子杀菌等有着重要的意义。

参 考 文 献

- 1 杨瑞霞. 炭疽芽胞恐怖及其相关问题. 军事医学科学院院刊, 2002, 26: 1-4.
- 2 王瑛. 细菌芽胞对微波抗力的测定. 中国消毒学杂志, 1985, 2: 25-27.
- 3 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范. 第 3 版. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1999. 10-11.
- 4 Foerster HF, Foster JW. Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. J Bacteriol, 1966, 91: 1168-1177.
- 5 Moir A, Lafferty E, Sminth DA. Genetics analysis of spore germination mutants of *Bacillus subtilis* 168: the correlation of phenotype with map location. J Gen Microbiol, 1979, 111: 165-180.
- 6 Hudson KD, Corfe BM, Kemp EH. Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. J Bacteriol, 2001, 183: 4317-4322.
- 7 Ireland JA, Hanna PC. Amino acid-and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* DeltaSterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. J Bacteriol, 2002, 184: 1296-1303.
- 8 Southworth TW, Guffanti AA, Moir A, et al. GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is an $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ antiporter. J Bacteriol, 2001, 183: 5896-5903.
- 9 Behravan J, Chirakkal H, Masson A, et al. Mutations in the gerP locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect the access of germinants to their target in the spore. J Bacteriol, 2000, 182: 1987-1994.
- 10 Clements MO, Moir A. Role of the gerI operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. J Bacteriol, 1998, 180: 6729-6735.
- 11 Barlass PJ, Houston CW, Clements MO, et al. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerL and gerQ operons. Microbiology, 2002, 148(Pt 7): 2089-2095.
- 12 郑光宇, 赵荣乐. 炭疽与炭疽杆菌. 生物学通报, 2001, 36(12): 1-3.

(收稿日期: 2004-09-16)

(本文编辑: 尹廉)