

一株微好氧趋磁细菌 TH-1 的分离及其磁小体研究

刘伟伟^{1,2}, 孙秀兰^{*1,2}, 张银志², 王进², 樊惠良³, 陈文君³

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 张家港出入境检验检疫局, 江苏 张家港 215500)

摘要: 研究生物磁学的性质, 从无锡太湖水域中分离到了一株沿着磁力线运动的微好氧细菌-趋磁细菌 TH-1。尽管在其他淡水中曾经分离到过趋磁细菌, 但却从未在太湖中分离到过, 因此 TH-1 是目前所见报道的第一株分离自太湖的趋磁细菌。采用透射电镜的方法对细菌进行了形态学观察, 结果表明, 每个细胞内含多个磁小体, 呈圆形, 直径范围在 10~100 nm, 分布在细胞质以及细胞壁前端。能谱结果显示, 该菌磁小体的元素组成为铁(Fe)、硫(S)和氧(O)。还对该菌以及磁小体的磁性进行了分析并且对菌株做了初步的生化鉴定。结果表明, 分离得到的菌株隶属于趋磁细菌。

关键词: 趋磁细菌, 纳米材料, 磁小体

中图分类号: Q 939 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0634-06

Isolation of a Microaerobic Magnetotactic Bacterium TH-1 and Studies on the Magnetosome

LIU wei-wei^{1,2}, SUN Xiu-lan^{*1,2}, ZHANG Yin-zhi¹, WANG Jin²,
FAN Hui-liang³, CHEN Wen-jun³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036; 3. Zhangjiagang Entry-Exit Inspection And Quarantine, Zhangjiagang 215500, China)

Abstract: In order to study the properties of biomagnetism, a kind of magnetotactic bacteria TH-1 which is able to respond and orient along the lines of terrestrial or artificial magnetic fields was isolated from Taihu lake. TH-1 is the first reported magnetotactic bacterium isolated from Taihu lake. Morphological observation was carried out using the transmission electron microscope and the results showed that magnetic cells each possess several magnetosomes that is circular-shaped and 10 nm-100 nm in diameter, which distributed in cytoplasm and the front cell wall. The Energy dispersive X-ray spectrum of magnetosome indicates that strain TH-1 consists of three mineral elements Fe, S and O. The magnetic properties both of the bacteria and magnetosomes were studied and a preliminary biochemical identification of the bacteria was carried out. All the above results demonstrated that strain TH-1 is magnetotactic bacteria.

Key words: magnetotactic bacteria, nano-material, magnetosome

收稿日期: 2011-08-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20806033); 张家港市科技局基金项目(ZKS0904)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面研究。
E-mail: sxlzzz@yahoo.com.cn

趋磁细菌是一类能够沿着磁力线运动的特殊细菌^[1],其细胞内含有特异性纳米颗粒-磁小体。磁小体成链状排列,形态均一,大部分处在稳定的单畴范围内。单个磁小体的形态、大小依细菌种类的不同而不同,不同细菌合成的磁小体其晶型具有严格的特异性^[2]。由于磁小体细小均匀、晶型规则独特、单畴等这些非生物源磁性颗粒所不具有的特性,趋磁细菌生物合成为生产高度特异性纳米磁性材料提供了新的途径。早在1991年,日本学者Matsunaga就预计趋磁细菌的磁小体在未来将是高新技术应用中的一种新的生物资源,经过多年的研究,磁小体已经广泛应用于生物活性物质的分离、检测、固定,药物的磁导向,细胞与分子的磁标记、磁分离和放射性核素的回收等方面^[3]。

1975年美国科学家Blakemore从美国马萨诸塞州的海泥中发现了趋磁细菌^[4],引起了世界各国科学家的关注,竞相展开研究,已从不同水域(淡水、海水、沉积物)和土壤中分离到多种趋磁细菌^[5-6]。这些趋磁细菌的形态是多样的,现已发现的有球菌、杆菌、弧菌、螺菌和多细胞聚合球菌,并且不同形态的趋磁细菌其所含磁小体的组成、晶型、尺寸都不尽相同,如MS-1水生趋磁螺菌的磁小体为50 nm的 Fe_3O_4 晶体,MV-1趋磁弧菌的磁小体为60 nm的 Fe_3O_4 晶体,而MMA多细胞聚集体的磁小体则为80 nm左右的 Fe_3S_4 晶体^[7]。研究表明趋磁细菌的生长条件和胞内结构以及磁小体的膜对磁小体的成型和大小均起着重要的作用,同一菌种磁小体的晶型具有严格的特异性。作者分离到的趋磁细菌产生的磁小体大小在10~100 nm之间且主要分布在两个粒径范围,10~20 nm为其中最主要的粒径分布区域,100 nm为另外一个主要的粒径分布区域。该细菌体内磁小体分布的区域较为特殊,粒径在10~20 nm的磁小体主要分布在细胞壁前端,排列不规则,不成链状分布;粒径100 nm的主要分布在细胞质中,排列则相对较为规则,为近似链状排列。目前发现的趋磁细菌,磁小体大部分分布在细胞质,也有趋磁细菌磁小体分布在细胞壁前端的报道^[8],但是细菌产生的磁小体同时分布在细胞质和细胞壁前端的磁小体组态目前还未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 柠檬酸 4.0 g/L;硝酸钠 0.50 g/L;硫酸铁 3.8 g/L;硫代乙醇酸钠 0.5 g/L;维生素液(VB_{12} 0.05 mg/L)10 mL;矿物质混合液(MgSO_4 0.01 mg/L, MnSO_4 0.01 mg/L, ZnSO_4 0.01 mg/L)10 mL^[9]。无特别说明,以下所述培养基均为此配方。

1.1.2 主要试剂及仪器 柠檬酸,硝酸钠,硫酸铁,硫代乙醇酸钠,维生素 B_{12} ,为分析纯;冷冻离心机:德国艾本德公司产品;光学数码显微镜:苏州欧卡精密光学仪器有限公司产品;透射电子显微镜:日本JEOL公司产品;强力磁铁、PH计:瑞士METTLER公司产品;恒温培养箱:上海市跃进医疗器械一厂生产;超声波细胞破碎仪:上海之信仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 泥样采集 泥样取自无锡太湖水域的底泥,取样水温20.5℃,水深2 m。

1.2.2 趋磁细菌的收集、富集与纯化 收集和富集方法见文献^[5]。具体如下:将泥样与培养基按1:2的比例放入白色塑料瓶中,将磁铁放在泥水界面之上1 cm附近大约一周的时间。整个磁取过程是在暗处避光进行的,以抑制其他光合细菌的生长。

培养一星期之后,吸取磁铁附近的液体培养基10 mL左右,然后加入已经灭过菌的另一液体培养基中,液体培养基配方同上,同时做空白对照。将培养液放在28℃的恒温培养箱中培养3 d,离心得到菌体。

取上述液体培养基加入2 g/dL琼脂粉,121℃灭菌20 min。将菌体收集液适当稀释,取1 mL于平皿内,将冷却后的琼脂培养基倒入,25℃下培养3~4 d。待菌落长出后,重复进行此操作,得到较纯的菌落,编号TH-1,以此菌株进行研究。

1.2.3 培养条件对TH-1菌株生长的影响 培养条件分为3种:25℃静置培养;25℃摇床培养;25℃充氮气静置培养。按照上述培养基和此培养条件,从第5 h开始以蒸馏水为对照,每2 h测一次 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.4 电镜观察与能谱分析 将培养物离心,菌体用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.7)洗两次,适当稀释后不固定不染色,直接上铜网,透射电镜下观察。

同时用超声波细胞破碎仪对趋磁细菌菌体进行破碎,细菌体内的磁小体释放,多次洗涤离心,得到较纯净的磁小体收集液。透射电子显微镜下观察并用能谱仪分析磁小体的元素组成,以铜网的空白区域作为对照。

1.2.5 细菌和磁小体磁性分析 利用振动样品磁强计,分别对菌体以及磁小体的磁性进行分析。趋磁细菌体内可以产生具有磁性的纳米材料物质磁小体,利用振动样品磁强计可以定量测定细菌以及磁小体的磁性强弱。

1.2.6 趋磁细菌的部分理化性质 菌株的部分生理生化试验参照文献[10]的方法进行。

1.2.7 菌株的初步鉴定 考虑到试验的目的和试验的可操纵性,采用 16S rDNA 序列分析法对细菌进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 趋磁细菌的富集

将磁铁放置在泥水界面一个星期之后,在磁铁与界面处出现一个黑色的点状聚集物,这是趋磁细菌的聚集物。吸取一定量的该菌液至载玻片上,在光学显微镜下用磁铁协助进行细菌运动性观察。放置磁铁之前,细菌处于游动稳定状态,当将磁铁放置在载玻片一侧的时候,细菌迅速朝着磁铁方向运动最后聚集成一条线状,表明收集到的细菌具有趋磁性。

2.2 趋磁细菌的单菌落分离

上述收集液经适当稀释后在固体平板上可形成单个白色菌落(见图 1),菌落大部分分布在培养基的中下部,且下部菌斑较中部的大,表面也会出现菌落,但是表面的菌落非常小,似针尖状。这可能与细菌对氧气的需求有关,在氧气含量相对较低的环境下细菌生长较好,菌落也较大,同理,中上部的菌落相对就较少较小。如果挑取单菌落划线培养,3~4 d 后可以看到,在划线处有菌落长出,菌落是向下生长的,从而间接说明该菌株是微好氧的。

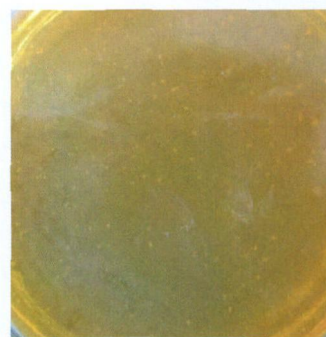


图 1 趋磁细菌菌落图

Fig. 1 Bacterial colony of TH-1 bacteria

2.3 电镜观察与能谱分析

透射电镜观察表明 TH-1 细胞内含多个磁小体,呈圆形,直径在 10~100 nm 左右(见图 2)。磁小体主要分布在两个区域,细胞质中央和细胞壁前端。分布在细胞壁前端的磁小体粒径较小,在 10~20 nm 之间,这些磁小体的数量相对较多,几乎周生在细胞壁前端。分布在细胞质中央的磁小体粒径较大,在 100 nm 左右,在电镜图中近似链状排列。

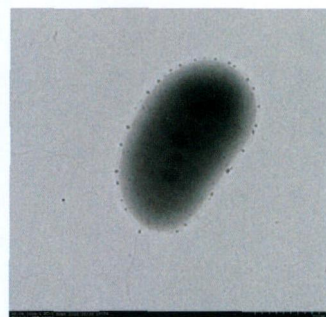


图 2 趋磁细菌 TH-1 透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron microscope photograph of the magnetotactic bacteria TH-1

将细胞破碎之后,可以得到纯净的磁小体收集液。透射电镜下纯净磁小体的形貌如图 3。图中磁小体大小均匀,单分散性良好。

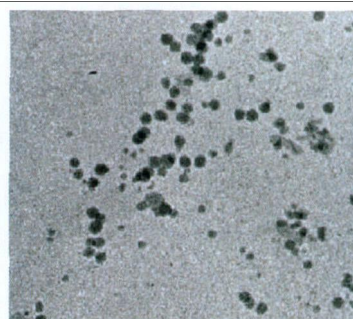


图 3 纯净磁小体的透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron microscope photograph of the pure magnetosomes

能谱分析显示该菌磁小体的元素组成为铁(Fe)硫(S)和氧(O),铁的氧化物和硫化物都是构成磁性材料的重要组成部分,其中铁质量分数占43.7%,S占48.2%,氧占8.1%。图4为扣除背底值之后磁小体的元素组成图。

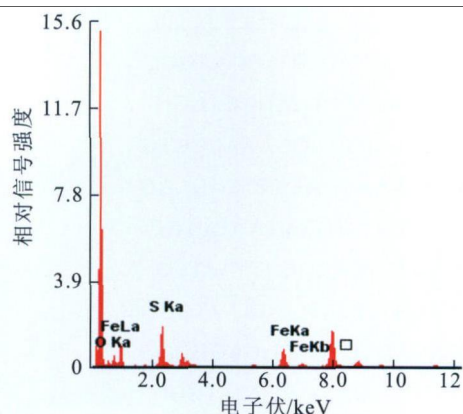


图4 TH-1菌株内磁小体的能谱分析

Fig. 4 Energy spectrum analysis of the magnetosomes in TH-1 bacteria

2.4 培养条件对 TH-1 菌株生长的影响

在不同的培养条件下培养细菌时,细菌表现出不同的生长情况,在摇床条件下培养和充氮气条件下培养时,细菌生长极其缓慢,OD600在0.2~0.3之间几乎趋于不变。在静置培养时细菌生长情况如下图5所示,培养3d之后,细菌进入稳定期,OD600可以达到1.0。在液体培养基中细菌主要集中分布在底层,中上层则较少见到细菌的生长。这些现象充分说明,该株细菌为微好氧细菌,在氧气充分或者完全厌氧的条件下细菌都不能较好生长。

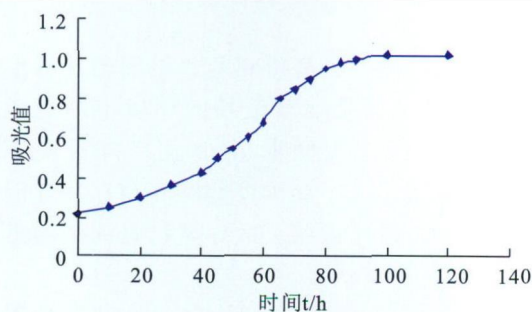


图5 静置条件下 TH-1 生长曲线

Fig. 5 Growth curve of the TH-1 in static condition

2.5 部分生理生化反应

TH-1菌株的部分生理生化试验结果见表1。该结果和先前报道的淡水趋磁细菌WD-1^[9]、MS-1^[3]的性状大部分一致。这可能与TH-1也是从淡

水水域分离到的细菌有关,关于TH-1的其他生理生化试验有待于进一步研究。

表1 TH-1的部分生理特性

Tab. 1 Some physiological properties of the TH-1 bacteria

部分特征反应	结论
革兰氏染色	阴性
过氧化氢酶反应	阴性
淀粉水解试验	阴性
马尿酸盐水解试验	阴性
厌氧硝酸盐生长试验	阴性

2.6 磁性分析

图6、7分别是表示细菌和磁小体磁性大小的曲线,由图可知,磁小体的饱和磁化强度在1.5emu/g左右,顽矫力为12.597 G。细菌饱和磁化强度为0.2 emu/g左右,顽矫力为15.444 G。将两者的磁滞回线进行比较,发现纯净趋磁细菌的饱和磁化强度较纯净磁小体的饱和磁化强度小,矫顽力较磁小体的大,这是因为趋磁细菌的磁性来源于磁小体的磁性,所以纯净磁小体收集液的磁性远大于趋磁细菌,且矫顽力小、磁性好。

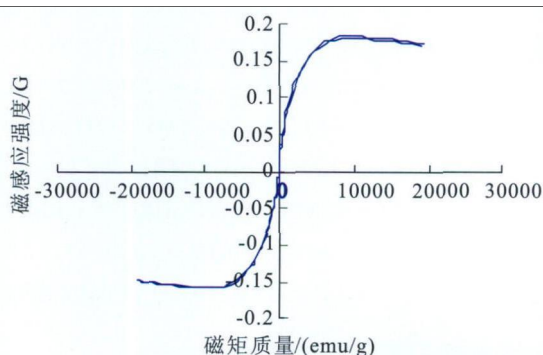


图6 TH-1菌株的磁滞回线

Fig. 6 Hysteresis loop of the bacteria TH-1

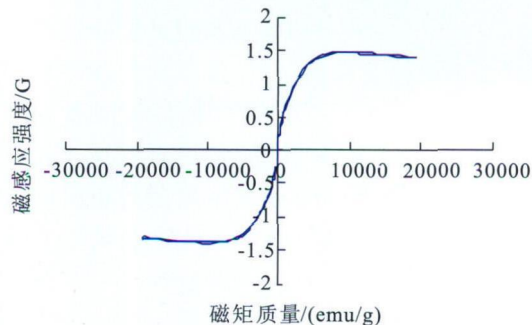


图7 磁小体的磁滞回线

Fig. 7 Hysteresis loop of the magnetosomes

2.7 菌株鉴定结果

最终得到的基因序列如下所示:

通过 16SrDNA 基因的 PCR 扩增及测序之后,

```
GCCTTACCATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAAAGC
GTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCA
CTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGC
GACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTG
ATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAG
GAAAGAAACGTCATGGGTAAATACCCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGC
ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCC
AGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAG
GTGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGC
GAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGG
CCTTCGGGCCTTGGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTCTGGAATGC
CGAAGAGATTTGGCAGTGCTCGCAAGAGAACCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
CATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAC
AATGGTCGGGACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCAGAAACCC
GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGGGGGCGA
TTA
```

趋磁细菌基因库 (Database of Magnetotactic Bacteria. <http://database.biomnsl.com/info8detailed.html>.) 中有目前所发现并已经测序的所有趋磁细菌菌种及基因序列, 将得到的该序列和趋磁细菌基因库中列出的基因序列在 NCBI 数据库中进行相似性比对, 结果发现, 该细菌的基因和变形菌门中 Betaproteobacteria-趋磁细菌的相似度最高, 达到 97%。结合上述分析, 该菌可能属于变形菌门中的 Betaproteobacteria-趋磁细菌。

3 结 语

趋磁细菌广泛存在于湖泊、海洋、土壤等自然

环境中, 不同的环境下分离得到的趋磁细菌其特性有些许不同, 这主要是细菌生长的环境不同造成的。太湖是中国第三大淡水湖, 水面广却深度不大, 平均水深只有 2 m。此深度的湖底存在氧气但是含量不会很大, 因此造就了微好氧趋磁细菌的出现。

目前, 趋磁细菌在多方面都有应用, 特别是用来合成生物纳米材料。细菌产生的磁小体较化学或其他方法合成的纳米磁珠有很多明显优势, 比如磁小体来自生物体内生物相容性比较高, 表面有相应的功能基团可以免去很多化学修饰的步骤。本

课题组从无锡太湖的底泥中分离到一株趋磁细菌 TH-1,与前人分离到的趋磁细菌相比,我们在太湖水域分离到的趋磁细菌 TH-1 在许多方面都具有独特性,特别是其产生的磁小体数目较多,并且磁小体为较为规则的圆形,没有其他不规则形状出现,从而可以更好的开发与利用磁小体。趋磁细菌 TH-1 胞内磁小体不呈链状排列,并且细菌体内的

磁小体在细胞质和细胞壁前端都有分布,这可能同菌株的遗传特性和培养条件有关,同时由于 TH-1 菌株是在水深 2 m 左右的湖底取样,其生态环境与其他菌株也有很大差异。磁小体不呈链状排列的现象文献也有报道^[11],同时前人也报道过磁小体分布在细胞壁前端的现象。综合考虑,磁小体合成的条件有待进一步摸索和改进。

参考文献(References):

- [1] Lins U, McCartney M R, Farina M. Crystal habits and magnetic microstructures of magnetosomes in coccoid magnetotactic bacteria[J]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2006, 78: 463—474.
- [2] Lins U, McCartney M R, Marcos Farina, et al. Habits of magnetosome crystals in coccoid magnetotactic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4902—4905.
- [3] 高峻,肖天,孙松,等. 新型海洋趋磁细菌 YSC-1 的分离及其特异性磁性纳米材料磁小体的研究[J]. *高技术通讯*, 2004, 5: 44—45.
GAO Jun, XIAO Tian, SUN Song, et al. Isolation of a novel marine magnetotactic bacterium YSC-1 and studies on the highly uniform, magnetic nano-material-magnetosome[J]. *Chinese High Technology Letter*, 2004, 5: 44—45. (in Chinese)
- [4] Richard B. FRANKEL. The discovery of magnetotactic/magnetosensitive bacteria[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(1): 1—2.
- [5] Christian Jogler, Wei Lin, Anke Meyerdierks. Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments[J]. *Appl. Environ Microbiol.* 2009, 75: 3972—3979.
- [6] Simmons S L, D A Bazylinski, K J Edwards. Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR[J]. *Environ Microbiol.* 2007, 9: 2162—2174.
- [7] 吴小玲,钟伟,都有为. 一株 G- 球形趋磁细菌的发现与表征[J]. *南京大学学报:自然科学*, 1999, 35(4): 430—431.
WU Xiao-ling, ZHONG Wei, DOU You-wei. Discovery and characterization of a strain of magnetotactic coccus[J]. *Journal of Nanjing University: Natural Sciences*, 1999, 35(4): 430—431. (in Chinese)
- [8] Richard B Frankel, Dennis A Bazylinski. Magnetosomes and magneto-aerotaxis[J]. *Contribution to Microbiology*. 2009, 16: 182—193.
- [9] 卫扬保,张洪霞,姜伟. 趋磁细菌研究 I: 武昌东湖水体中趋磁细菌 WD-1 的分离[J]. *武汉大学学报:自然科学版*, 1994 (6): 115—118.
WEI Yang-bao, ZHANG Hong-xia, JIANG Wei. The research of magnetotactic bacteria I: The isolation of the magnetotactic bacteria WD-1 from the east lake in Wuchang[J]. *Journal of Wuhan University: Natural Science Edition*, 1994(6): 115—118. (in Chinese)
- [10] 东秀朱,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001, 353.
- [11] Frank G Rodgers, Richard P Blakemore, Nancy A Blakemore, et al. Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote[J]. *Arch Microbiol.* 1990, 154: 18—22.