

氢氧化钠对苏云金芽孢杆菌芽孢及其萌发的影响* Effect of NaOH on the *Bacillus thuringiensis* Spores and Its Germination

陈欢君^{1,2},周 泉³,王晓春²,张云开^{1**},王桂文^{2**}

CHEN Huanjun^{1,2},ZHOU Quan³,WANG Xiaochun²,ZHANG Yunkai¹,
WANG Guiwen²

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530004;2. 广西科学院,广西南宁 530007;3. 广西大学农学院,广西南宁 530004)

(1. College of Life Sciences & Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China;2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China;3. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】了解碱对细菌芽孢及萌发的影响及机制,进一步认识芽孢的抗性,为寻找更好的杀灭芽孢的方法提供理论参考。【方法】应用单细胞拉曼光谱采集经 NaOH 处理后的单个苏云金芽孢杆菌(Bt)芽孢的拉曼光谱,并应用微分干涉差显微镜成像术分析其萌发动态。【结果】1.0 mol/L NaOH 处理 30 min、45 min 和 60 min 后, Bt 芽孢的存活率分别为 25.0%、3.6%和 1.8%左右;芽孢吡啶二羧酸(DPA)和蛋白质的特征峰有微弱的降低,蛋白质二级结构 α 螺旋特征峰($1\ 280/1\ 652\ \text{cm}^{-1}$)的位置和信号强度与对照没有明显的差异。在 10 mmol/L 丙氨酸下,单个芽孢开始大量释放 CaDPA 的时间(T_{lag})、快速释放 CaDPA 所需的时间($\Delta T_{\text{release}}$)和芽孢皮层水解所需的时间(ΔT_{lys})分别是对照的 3.5~5 倍、12~13 倍和 1.5~2 倍;在月桂胺触发下, T_{lag} 值和 $\Delta T_{\text{release}}$ 值分别是对照的 4 倍和 11 倍左右。外源 CaDPA 无法触发处理 30 min 后的芽孢的萌发,而对照则萌发极快。【结论】NaOH 处理没有破坏 Bt 芽孢的内膜,也没有引起成孢内 CaDPA 泄漏,但令与芽孢萌发相关的蛋白质受损,受损最严重的是皮层水解酶,对芽孢萌发产生严重的影响。

关键词:苏云金芽孢杆菌芽孢 拉曼光谱 DIC 成像 碱 芽孢萌发

中图分类号:Q935, Q937 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2017)03-0303-08

Abstract:【Objective】To determine the effect and mechanism of alkali on *Bacillus thuringiensis* (Bt) spores and its germination and to further understand the resistance of spores can provide a theoretical reference for seeking better ways to kill bacterial spores.【Methods】Single-cell Raman spectroscopy was used to analysis the spores treated by alkali at room temperature, and differential interference contrast (DIC) microscopy imaging was used to monitor the kinetics of

spore germination.【Results】The viability of Bt spores was 25.0%, 3.6% and 1.8%, respectively, when treated with 1.0 mol/L NaOH for 30, 45 and 60 min. There was slightly decreased intensity at Raman bands from dipicolinic acid (DPA) and proteins, while there was no evident difference on the positions and intensities of α -helical structures ($1\ 280, 1\ 652\ \text{cm}^{-1}$) between treated and untreated spors. When treated spores germinated in L-alanine, the time, T_{lag} , at which

收稿日期:2016-12-01

修回日期:2017-03-10

作者简介:陈欢君(1991-),男,硕士研究生,主要从事细菌芽孢萌发机理研究。

* 国家自然科学基金项目(11264004,31460035)资助。

** 通信作者:张云开(1972-),男,副研究员,主要从事微生物工程研究,E-mail:yykzhang@gxu.edu.cn;王桂文(1969-),男,研究员,主要从事生物物理与应用微生物研究,E-mail:wguiwen@gxas.cn。

spores began release of the great majority of their 1 : 1 chelate of Ca^{2+} and DPA (CaDPA), the time periods, $\Delta T_{\text{release}}$, at which a spore germinating completed the release of the great majority of its CaDPA, and the time periods, ΔT_{lys} , at which a spore completed the hydrolysis of peptidoglycan cortex, was about 3.5~5, 12~13 and 1.5~2 times of the untreated spores, respectively. The T_{lag} and $\Delta T_{\text{release}}$ values were about 4 and 11 times of untreated spores when germinated with dodecylamine. However, treated spores did not germinate in exogenous CaDPA. **【Conclusion】** These results indicate that alkali does not disrupt the Bt spores permeability barrier and the spore does not lose its DPA, but some proteins important in spore germination are damaged by alkali, and the cortex-lytic enzymes are the target of alkali damage which has a great effect on the germination of Bt spores.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Raman spectroscopy, DIC microscopy imaging, alkali, spore germination

0 引言

【研究意义】芽孢是部分细菌在遇到不良生长条件时形成的休眠体。由于含水量极低,而且富含2,6-吡啶二羧酸与钙离子结合形成的 CaDPA 络合物(约占细胞干重 10%),再加上孢外厚厚的芽孢衣,芽孢对辐射、高温、干燥、极端 pH 值、静水压和一些有毒化学品等有很强的抵抗能力,是细菌的一种生存策略^[1-2]。另外,芽孢内核富含的一组小的酸溶性蛋白质(Small acid soluble proteins)也对 DNA 起保护作用^[3]。由于芽孢的强抗逆能力,常规的灭菌方法如巴氏灭菌、熏蒸灭菌、煮沸灭菌无法将细菌芽孢彻底杀灭,而采用高温高压或者一些物理手段如紫外线来灭菌,可能对灭菌对象(如器械、食品等)产生破坏或者受条件限制无法实施。对于细菌芽孢的控制,一方面是设法让芽孢萌发使其失去各种抗性,然后使用常规的方法将其杀灭;或者是设法抑制或者破坏芽孢的萌发,使其无法萌发或者无法进一步生长。因此了解芽孢的抗性,了解杀菌剂对芽孢的杀灭机理,对寻找更为有效合理的芽孢杀灭方法有重要意义。**【前人研究进展】**已有大量的文献报道如何杀灭细菌芽孢及其杀灭机制,包括辐射、热处理和各种化学药剂^[1],其中杀灭芽孢的化学药剂种类繁多,应用广泛^[4]。强碱类物质不是常用的、直接的消毒剂,但通常以一定比例出现消毒剂中。萌发是芽孢进一步繁殖生长的重要起点,与萌发相关的任何途径或者部件受损芽孢就可能无法萌发而失去繁殖能力。芽孢既可以由营养萌发剂来触发,也可由非营养性物质或物理因素来触发,萌发剂受体、CaDPA 释放通道蛋白、皮层水解酶等参与其中^[5-7]。通过观察处理后的芽孢萌发过程,可以了解到各种灭菌措施或化学药剂杀灭活芽孢的机制。拉曼光谱是一种分子振动光谱,具有实时、快速、无损分析的优势,可以提供丰富的分子结构和组成信息,

在生物学及微生物单细胞分析领域有广泛的应用^[8-9]。多细胞实时微分干涉差(Differential interference contrast, DIC)显微镜术实现了单细胞水平高通量分析单个细菌芽孢的萌发动态,对认识芽孢的萌发机制起到很大的促进作用^[7,10-12]。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)具有独特的杀虫特性,能高效灭杀鳞翅目幼虫而对哺乳动物几乎无害,是目前应用最广泛、生产规模最大的微生物杀虫剂^[13-14]。Bt 与蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)虽在宿主范围以及对农业和人类健康的影响方面有很大差异,但是在遗传上十分相近^[15]。已有文献从群体水平报道强碱对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)芽孢萌发的影响,认为强碱并不直接杀灭芽孢,而是使皮层水解酶失活,从而使芽孢无法萌发^[16],但没有在单细胞水平上展开研究,无法了解具体的芽孢萌发细节,也不清楚碱处理对芽孢的其它组件是否产生影响。**【本研究切入点】**应用单细胞拉曼光谱分析 NaOH 处理后的单个 Bt 芽孢胞内主要成分和结构的变化,应用实时 DIC 显微镜从单细胞水平监测 NaOH 处理后 Bt 芽孢的萌发动态和萌发参数。**【拟解决的关键问题】**追踪分析经 NaOH 处理后的单个 Bt 芽孢在不同萌发剂触发下的萌发动态,获知 NaOH 处理对 Bt 芽孢与芽孢萌发的影响,从单细胞水平进一步了解强碱类物质对芽孢的杀灭机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及培养基

菌株:苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*) HD-1 菌株,HD-1 为库斯塔克亚种,购自中国普通微生物菌种保藏中心,编号为 AS 1.1014。

种子培养基(LB):蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 值 7.4~7.6。

液体培养基(CCY):谷氨酰胺 20 mg,酸水解干

酪素 1 g, 酶水解干酪素 1 g, 酵母提取物 0.4 g, 甘油 0.6 g, 去离子水定容至 1 000 mL, 在定容前添加以下终浓度的微量元素: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mmol/L, $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mmol/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mmol/L, ZnCl_2 0.05 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mmol/L, KH_2PO_4 13 mmol/L, K_2HPO_4 26 mmol/L。121℃, 20 min 灭菌。

1.2 芽胞制备

菌株在 LB 固体培养基活化 24~36 h, 挑取单菌落, 转接入 LB 液体培养基, 200 r/min 过夜培养, 取 1% 菌液转入产孢培养基 (CCY), 200 r/min, 培养 48~60 h。上述培养过程均在 30℃ 下进行。镜检芽胞率达到 99% 后, 5 000 r/min 离心 10 min 收集、纯化芽胞, 无菌水洗涤 10 次。最后用无菌水悬浮, 4℃ 保存备用。

1.3 NaOH 处理与芽胞萌发

1.3.1 芽胞 NaOH 处理

取 $OD_{600} = 10.0$ 的 Bt HD-1 芽胞 0.2 mL, 5 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 加入 1 mL 1.0 mol/L 的 NaOH, 25℃ 下处理 30 min、45 min 或者 60 min; 常温下 8 000 r/min 离心 2 min, 去掉上清部分, 加入 2.0 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.4) 中和, 无菌去离子水洗 3 次。用 0.1 mL 无菌水悬浮后放 4℃ 冰箱保存备用。用无菌去离子水代替 NaOH 做同样处理, 作为对照。

1.3.2 芽胞存活率的测定

将处理过的芽胞稀释 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 倍, 吸取 0.1 mL 均匀涂布在 LB 培养基平板上, 每个梯度 3 个平板, 30℃ 暗培养 24~36 h, 选择 50~300 个菌落范围内的平板计数, 统计 NaOH 处理后能在 LB 培养基上形成的菌落数, 以不处理的芽胞为对照, 计算能长成菌落的芽胞培养率, 作为芽胞的存活率。

1.3.3 拉曼数据采集

本实验室自主搭建激光光镊拉曼光谱系统, 如 Xie 等^[17-18] 所描述。将波长 780 nm 的激光束导入倒置显微镜 (TE2000U, Nikon), 激光光束经油镜聚焦, 形成光势阱来捕获细胞, 成像聚焦进光谱仪并被 CCD 检测。用聚苯丙乙烯微球 (直径约 2.0 μm) 进行系统校正。

芽胞悬浮于无菌水中, 放入样品槽内, 在 100 倍显微镜物镜下, 光镊随机捕获单个芽胞, 收集目标芽胞拉曼光谱, 信号积累时间为 10 s, 每个样品收集 50 个光谱, 5 个背景光谱。单个芽胞光谱经系统系数校正, 减去背景并经 5 点相邻平滑, 用 Matlab 自编程序读取 1 017 cm^{-1} 峰的总面积。

1.3.4 芽胞萌发实时观测

待分析的 Bt 芽胞用无菌水稀释为 10^8 个芽胞/mL, 经 70℃ 水浴 30 min、0℃ 冰浴 15 min 热激处理, 吸取 2 μL 菌液滴加在盖玻片上, 真空干燥, 将盖玻片固定在自制的恒温平台上, 加入预热好的萌发剂。对 DIC 显微镜 (Olympus IX81) 加以改造, 接入高性能 CCD, 实现实时监测芽胞萌发过程^[12]。根据实验需要, 每 6 s 采集一幅 DIC 图像, 持续观察 60~120 min。

监测以下几个方面的芽胞萌发: (1) 营养萌发, 50 mmol/L 丙氨酸和 25 mmol/L Hepes 缓冲液 (pH 值为 7.4), 37℃ 萌发; (2) 非营养萌发, 45 mmol/L CaDPA, 30℃; 或者 0.8 mmol/L 月桂胺和 25 mmol/L Hepes 缓冲液 (pH 值为 7.4), 45℃。CaDPA 触发的芽胞不需要热激处理。

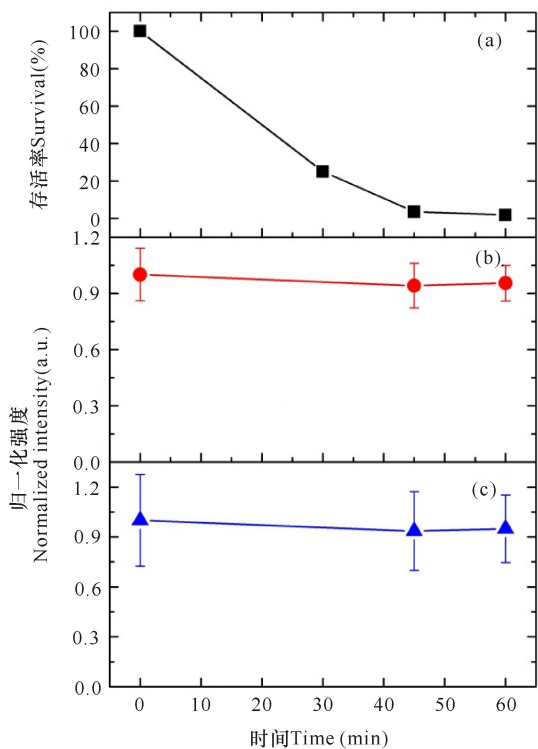
细菌芽胞的萌发过程经历 3 个阶段, 通过 DIC 成像方法可以很直观地观察到芽胞萌发的这 3 个进程^[11-12]。将 CaDPA 开始快速释放的时间、完全释放的时间点和肽聚糖皮层完全水解的时间点分别定义为 T_{lag} 、 T_{release} 和 T_{lys} , 则 CaDPA 快速释放所需要的时间 $\Delta T_{\text{release}} = T_{\text{release}} - T_{\text{lag}}$, 皮层水解所需时间 $\Delta T_{\text{lys}} = T_{\text{lys}} - T_{\text{release}}$, 将 T_{lag} 、 T_{release} 时对应的芽胞相对亮度定义为 I_{lag} 、 I_{release} (以加入萌发剂时的初始亮度为 100%, 以萌发结束后 20 min 的亮度为 0, 参见结果部分和文献^[12])。

2 结果与分析

2.1 NaOH 处理对 Bt 芽胞的影响

虽然在日常生活中较少用强碱作为杀菌剂, 但强碱还是杀灭芽胞的有效手段。图 1 显示, 1.0 mol/L NaOH 处理一定时间后绝大多数的芽胞都失去了活力, 30 min、45 min 和 60 min 后 Bt 芽胞的可培养率分别为 25.0%、3.6% 和 1.8% 左右。拉曼光谱数据显示, NaOH 处理后芽胞吡啶二羧酸 (DPA) 的特征峰 1 017 cm^{-1} 峰和蛋白质的特征峰 1 650~1 670 cm^{-1} 的峰强度仅有微弱的降低, 芽胞内部的 DPA 极少泄漏, 和 Setlow 等^[16] 的发现基本相同。而蛋白质二级结构 α 螺旋特征峰 (1 280/1 652 cm^{-1}) 的位置和信号并没有明显的改变。图 2 是 Bt 芽胞的拉曼光谱, 其中 662 cm^{-1} , 825 cm^{-1} , 1 017 cm^{-1} , 1 397 cm^{-1} 和 1 572 cm^{-1} 是源自 CaDPA 的典型特征峰, 而 1 652 cm^{-1} 是来自蛋白质酰胺 I 的二级结构 α 螺旋^[19-20]。图中显示, 即使是处理 60 min 的芽胞, 除因为少量 CaDPA 泄漏而导致的拉曼光谱信号减弱外, 蛋白质峰, 特别是 1 652 cm^{-1} 峰的强度和位置并没有

明显的改变,说明 NaOH 处理并没有导致芽孢内蛋白质结构发生明显改变。



(a)芽孢存活率;(b)蛋白质特征峰(1 650~1 670 cm^{-1}); (c)CaDPA 特征峰(1 017 cm^{-1})

(a) Survival of NaOH-treated spores; (b) Raman bands from proteins (1 650~1 670 cm^{-1}); (c) Raman bands from CaDPA (1 017 cm^{-1})

图1 NaOH 处理后 Bt 芽孢的存活率及拉曼峰的平均信号强度

Fig. 1 Survival of Bt spores and averaged intensities of Raman bands

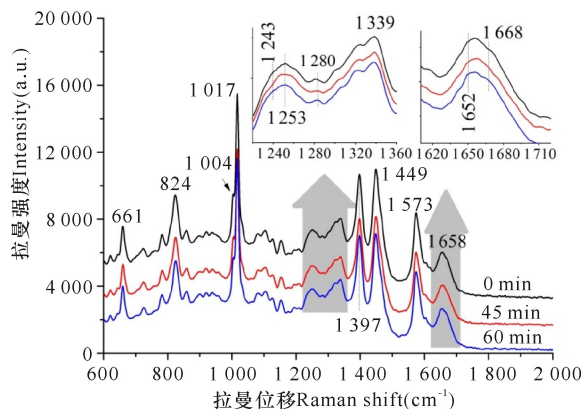


图2 NaOH 处理后单个 Bt 芽孢的平均拉曼光谱

Fig. 2 Raman spectra of individual *B. thuringiensis* HD-1 spores

2.2 NaOH 处理对单个 Bt 芽孢萌发的影响

2.2.1 营养萌发

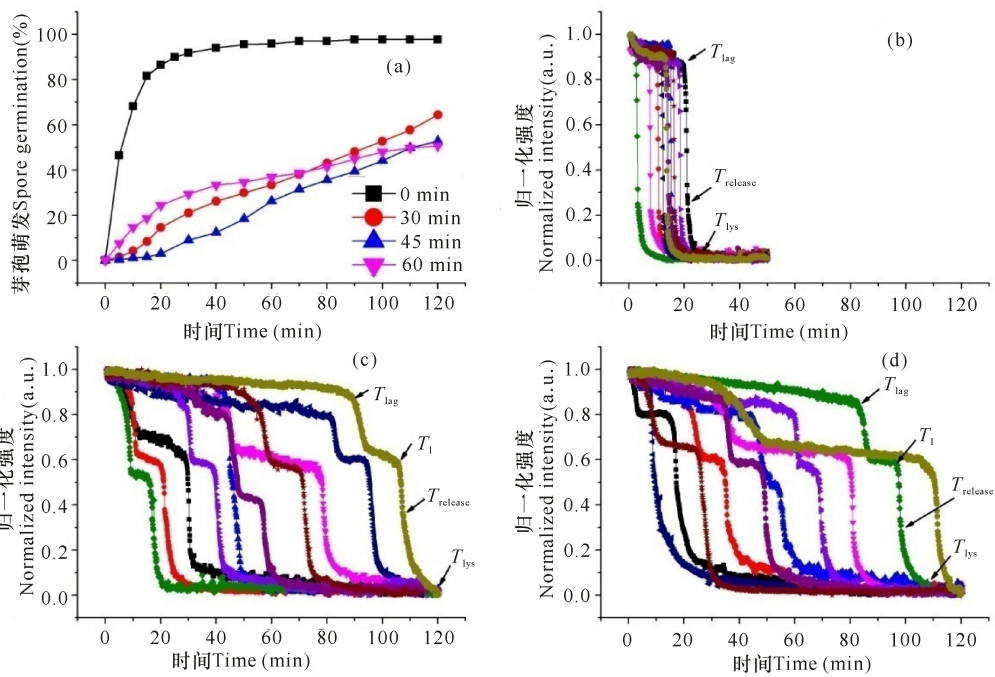
拉曼光谱数据显示 NaOH 处理后的芽孢蛋白质的二级结构并没有发生显著的变化,但其存活率却显著降低,预示着强碱处理影响到芽孢的萌发能力。图

3a 是处理后的芽孢在 50 mmol/L 丙氨酸触发下的群体萌发曲线,图中显示多数对照芽孢在 20 min 内萌发,而 NaOH 处理严重影响 Bt 芽孢的萌发,萌发缓慢,NaOH 溶液处理 30 min、45 min 和 60 min 后,芽孢在其 120 min 观察期内的萌发率依次为 64.4%、52.8%和 50.7%左右。

图 3b~c 显示单个芽孢的萌发动态,没有经过 NaOH 处理的芽孢萌发极其快速,每个芽孢的萌发动态曲线基本类似;萌发参数显示(表 1),CaDPA 快速释放的启动时间(T_{lag})仅为 9 min 左右,CaDPA 快速释放所需的时间($\Delta T_{\text{release}}$)约为 1.3 min 左右。然而处理后的芽孢, T_{lag} 和 $\Delta T_{\text{release}}$ 值显著增加,分别是对照的 3.5~5 倍和 12~13 倍;芽孢皮层水解所需要的时间(ΔT_{lys} 值)也增加,是对照的 1.5~2 倍。不同处理时间的 $\Delta T_{\text{release}}$ 值基本接近,随着处理时间的延长而有升高趋势。值得关注的是 CaDPA 释放的过程,即 $\Delta T_{\text{release}}$ 值,单个芽孢的动态曲线显示碱处理芽孢 T_{lag} 后的 CaDPA 释放普遍存在两个阶段,即图中 $T_{\text{lag}} \sim T_1$ 和 $T_1 \sim T_{\text{release}}$ 阶段。定义快速释放的第二个阶段的开始时间为 T_1 ,相应的芽孢相对亮度为 I_1 , $\Delta T_1 = T_{\text{release}} - T_1$ 。显然, $T_{\text{lag}} \sim T_1$ 阶段明显长于 $T_1 \sim T_{\text{release}}$ 阶段,前者约是后者的 6 倍。参数 I_{lag} 和 I_1 ,是 T_{lag} 和 T_1 时芽孢的相对亮度,它的大小间接反映 T_{lag} 和 T_1 时孢内的 CaDPA 含量^[21]。进一步分析发现,在 T_{lag} 前已有 15%~20%的 CaDPA 释放到孢外,而 $T_{\text{lag}} \sim T_1$ 阶段释放的 CaDPA 约为整个萌发过程的 34%~37%, $T_1 \sim T_{\text{release}}$ 阶段为 44%~52%,显然主要的 CaDPA 是在 $T_1 \sim T_{\text{release}}$ 阶段(2.3 min 左右)释放的。上述结果表明,NaOH 处理显著影响 Bt HD-1 芽孢的营养萌发。

2.2.2 非营养萌发

测试 CaDPA 和月桂胺等非营养萌发剂触发的芽孢萌发,结果发现外源 CaDPA 无法触发 NaOH 处理后的 Bt 芽孢,而对照芽孢却萌发极其快速,98%的芽孢在 20 min 内萌发(图 4a)。月桂胺触发的芽孢萌发与丙氨酸触发的萌发类似,NaOH 处理 30 min 的芽孢在其 120 min 观察期内的萌发率仅 20%左右,处理 60 min 的芽孢几乎都不萌发(图 4b)。单个芽孢的动态曲线显示,NaOH 处理的芽孢其 T_{lag} 后 CaDPA 释放也普遍存在两个阶段(图 4d)。处理 30 min 的芽孢, T_{lag} 和 $\Delta T_{\text{release}}$ 值是对照的 4 倍和 11 倍左右, $T_{\text{lag}} \sim T_1$ 阶段释放的 CaDPA 约为整个萌发过程的 40%左右, $T_1 \sim T_{\text{release}}$ 阶段为 30%左右(表 2)。



(a) 萌发曲线; (b) 对照; (c) NaOH 处理 30 min; (d) NaOH 处理 60 min

(a) Spore germination curves; (b) Contrast; (c) Treated with NaOH for 30 min; (d) Treated with NaOH for 60 min

图 3 NaOH 处理后 Bt 芽胞的丙氨酸萌发曲线及单个芽胞的萌发动态

Fig. 3 L-alanine germination of alkali-treated Bt spores(a) and germination kinetic of 10 individual spores(b~d)

表 1 NaOH 处理不同时间后 Bt 芽胞在丙氨酸触发下的萌发参数(平均值±标准差)

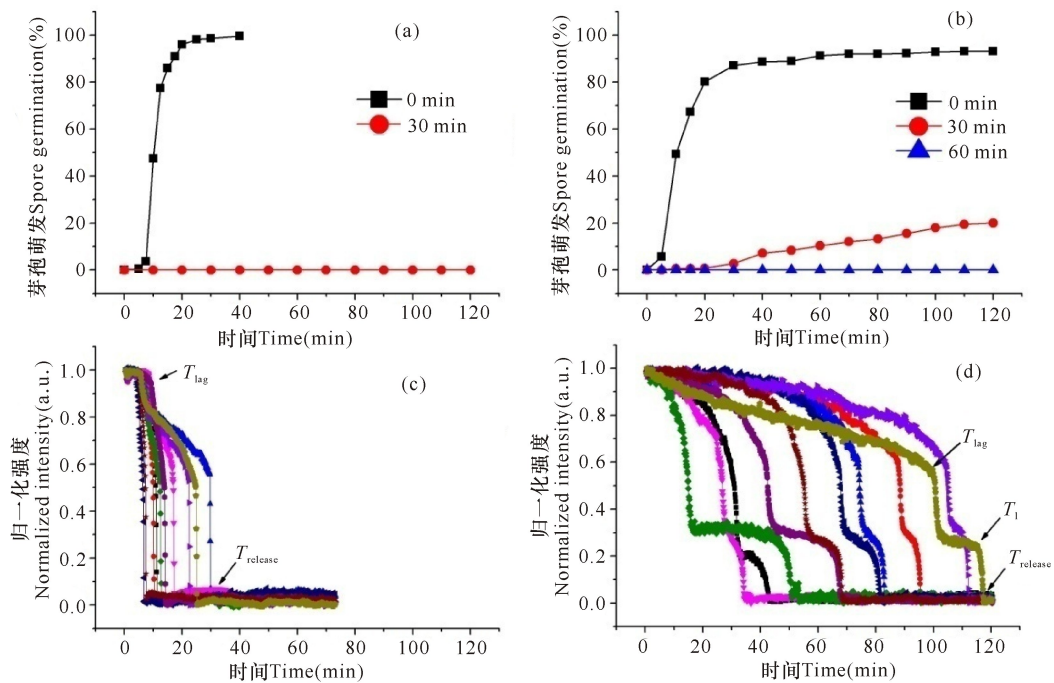
Table 1 Germination parameters of alkali-treated *B. thuringiensis* spores triggered by 50 mol/L L-alanine (mean±standard deviation)

碱处理时间 Treatment time (min)	T_{lag} (min)	T_1 (min)	$T_{release}$ (min)	T_{lys} (min)	$\Delta T_{release}$ (min)	ΔT_1 (min)	ΔT_{lys} (min)	I_{lag} (%)	I_1 (%)	$I_{release}$ (%)	芽孢萌发率 Spore germination (%)
0	9.2+7.9	/	10.5+8.0	12.5+8.3	1.3+0.3	/	2.0+0.8	97.5+2.3	/	24.7+5.6	97.8
30	48.4+26.9	62.0+27.1	64.2+27.1	67.5+27.4	15.8+11.3	2.1+1.3	3.3+1.7	84.5+11.9	60.4+12.6	29.0+9.1	64.4
45	47.3+29.6	61.0+28.1	63.3+28.1	66.9+27.7	16.0+11.8	2.3+1.4	3.6+2.2	88.7+11.5	63.5+13.5	29.2+9.3	52.8
60	32.8+30.2	47.6+32.2	50.1+32	54.3+31.4	17.3+16.0	2.5+2.6	4.2+1.9	88.1+14.4	67.7+14.5	35.1+10.4	50.7

表 2 NaOH 处理不同时间后 Bt 芽胞在月桂胺触发下的萌发参数(平均值±标准差)

Table 2 Germination parameters of NaOH-treated *B. thuringiensis* spores with 0.8 mmol/L dodecylamine (mean±standard deviation)

碱处理时间 Treatment time (min)	T_{lag} (min)	T_1 (min)	$T_{release}$ (min)	$\Delta T_{release}$ (min)	ΔT_1 (min)	I_{lag} (%)	I_1 (%)	$I_{release}$ (%)	芽孢萌发率 Spore germination (%)
Control	13.5+17.5	/	17.6+16.5	4.1+2.7	/	90.1+14.1	/	4.2+5.6	88.9
30 min	59.5+29.4	72.9+29.7	75.0+29.4	15.4+11.3	2.1+1.7	70.9+11.0	33.0+20.2	5.3+7.4	20.0



(a)CaDPA 萌发;(b)月桂胺萌发;(c)对照;(d)NaOH 处理 30 min

(a)CaDPA germination;(b)Dodecylamine germination;(c)Contrast;(d)Treated with NaOH for 30 min

图 4 Bt 芽胞的非营养萌发(a,b)及单个芽胞的月桂胺萌发动态(c,d)

Fig. 4 Non-nutrient germination of alkali-treated Bt spores (a,b) and germination kinetic of 10 individual spores(c,d)

3 讨论

苏金云芽孢杆菌对强碱有较强的抵抗能力,即使是 1.0 mol/L NaOH 处理 60 min 仍然有约 2%左右的芽胞能在 LB 培养基平板上形成菌落。但拉曼光谱显示,与 CaDPA 和蛋白质相关峰的位置并没有明显改变,只是强度有微弱的降低,与湿热处理明显不同,后者引起与芽孢蛋白质二级结构相关的 1 220~1 290 cm^{-1} 和 1 620~1 680 cm^{-1} 峰强度和位置的改变^[21]。虽然拉曼光谱数据显示蛋白质二级结构没有明显的改变,但 NaOH 处理后芽胞的萌发受到严重的影响。

芽胞萌发的几个阶段,都与相关蛋白质有关联。第一个阶段的相关蛋白是感受营养萌发剂的萌发剂受体如 GerA、GerB、GerK 等和传递萌发信号的 GerC、GerD 等蛋白^[7]。 T_{lag} 值是芽胞接触到萌发剂到开始大量快速释放 DPA 的时间,影响 T_{lag} 值的因素包括热激活、单个芽胞上萌发剂受体的数量和萌发剂的浓度^[20]。在相同的萌发条件下,造成 NaOH 处理后芽胞营养萌发的 T_{lag} 值显著增加的可能原因是芽胞上能感受到萌发剂的受体蛋白数量减少,亦即 NaOH 可能令部分萌发剂受体受损、失去功能。

芽胞在接收到萌发信号后,经过相关的信号传递(其传递机制尚未明了)后,打开芽胞内膜上的 CaD-

PA 释放通道,引起 CaDPA 快速释放。这是个独立过程,与萌发剂浓度、受体蛋白数量和热激活无关^[22]。目前已知的相关蛋白是 SpoVA。SpoVA 蛋白是孢子形成时摄取 CaDPA 的关联蛋白,与芽胞萌发过程中的 CaDPA 的释放也有关联^[23]。图 3 和表 1 的萌发参数显示,NaOH 处理后,多数芽胞的 CaDPA 的快速释放变成两个阶段, $\Delta T_{\text{release}}$ 值几乎增加 10 倍,但是随着 NaOH 处理时间的增加, $\Delta T_{\text{release}}$ 值并没有显著增加,说明 NaOH 处理可能损伤 Bt 芽胞上与 CaDPA 释放有关的通道以及相关的蛋白。

月桂胺是一种表面活性剂,其萌发机制是直接或者间接打开芽胞内膜的 CaDPA 释放通道,引起 DPA 和胞内小分子释放,和萌发剂受体和芽胞皮层水解酶没有关系,但芽胞不会进一步形成营养细胞^[24-25]。经 NaOH 处理后的芽胞,月桂胺萌发和营养萌发基本类似,进一步证明 NaOH 处理可能损伤了与 CaDPA 释放有关的通道以及相关的蛋白。

I_{lag} 是 T_{lag} 时芽胞的相对亮度,间接反映 T_{lag} 时胞内 CaDPA 含量^[21]。考察单个芽胞的萌发动态显示(图 3c~d),NaOH 处理后的芽胞 I_{lag} 值低于对照芽胞,这和经湿热处理的芽胞萌发动态类似^[21],说明 T_{lag} 前已经有一定量的 CaDPA 缓慢地释放出来,约为 15%~20%,而对照为 8%左右。在月桂胺萌发中, T_{lag} 前释放的 CaDPA 更多,达到 30%左右,这些

数据从另一个角度说明 NaOH 处理对 CaDPA 释放通道以及相关的蛋白产生影响。

芽胞皮层肽聚糖水解是芽孢萌发的另一个关键事件,只有随着皮层的水解,芽胞才能吸水更多的水分并逐渐膨胀变大,进而最终完成萌发进程形成营养细胞。此外,外源 CaDPA 触发的芽胞萌发首先通过激活芽胞衣上的皮层水解酶 CwlJ,进而触发胞内的 CaDPA 释放。因此一旦皮层水解酶 CwlJ 受损,外源 CaDPA 就无法触发芽胞的萌发。图 4a 显示 NaOH 处理 30 min 后 Bt 芽胞在 120 min 内没有萌发,说明 NaOH 处理令 CwlJ 酶完全失去功能,这应当是 NaOH 令芽胞失活的主要原因。表 1 的数据还显示,在营养萌发中,NaOH 处理令芽胞萌发的 ΔT_{lys} 值明显增加,约为对照的 1.5~2 倍,说明 NaOH 对另一种皮层水解酶 SleB 也产生严重影响。

从上述的分析我们知道碱处理并没有破坏 Bt 芽胞的内膜,也未造成胞内 CaDPA 的过多外泄,对芽胞蛋白质的二级结构影响也不显著,这可能是得益于 CaDPA 对芽胞的保护作用^[26]。NaOH 处理 60 min 后 98% 以上的芽胞已经不能在营养培养基上形成菌落(图 1a),但多数芽胞在丙氨酸触发下仍能完成胞内 CaDPA 的释放过程,虽然萌发缓慢(图 3)。因此,NaOH 处理对芽胞的营养萌发剂受体的功能损伤并不严重,受损最严重的是皮层水解酶,其次是 DPA 释放通道及相关蛋白。

4 结论

利用光镊拉曼技术分析 NaOH 处理对 Bt 芽胞的影响,并用 DIC 显微镜成像技术对芽胞的萌发过程进行监测,结果发现 NaOH 并没有破坏 Bt 芽胞的内膜,蛋白质的二级结构变化不明显。1.0 mol/L NaOH 处理 30~60 min 后 75% 以上的芽胞无法形成新的菌落,而 50% 以上的芽胞能在丙氨酸的触发下萌发,但不能在外源 CaDPA 触发下萌发。因此,NaOH 对参与芽胞萌发的重要相关蛋白质都有破坏作用,受损最严重的是皮层水解酶,其次是 DPA 释放通道及相关蛋白。

参考文献:

[1] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-525.

[2] SETLOW P. Spore resistance properties[J]. Microbiology Spectrum, 2014, 2(5). DOI:10.1128/microbiolspec.

[3] SETLOW P. I will survive: Protecting and repairing

spore DNA[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(9): 2737-2741.

[4] RUSSELL A D. The bacterial spores and chemical sporicidal agents. [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1990, 3(2): 99-119.

[5] MOIR A. How do spores germinate? [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 526-530.

[6] SETLOW P. Spore germination[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(6): 550-556.

[7] SETLOW P. Summer meeting 2013—When the sleepers wake: The germination of spores of *Bacillus* species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(6): 1251-1268.

[8] PETRY R, SCHMITT M, POPP J. Raman spectroscopy—A prospective tool in the life sciences[J]. Chemphyschem, 2003, 4(1): 14-30.

[9] HUANG W E, LI M Q, JARVIS R M, et al. Shining light on the microbial world: The application of Raman microspectroscopy[J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 70: 153-186.

[10] 陈越, 王璐玮, 陶站华, 等. 光学技术的创新应用: 细菌芽胞萌发机理研究[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(10): 100002.

CHEN Y, WANG L W, TAO Z H, et al. Novel application of optical techniques: Revealing the mechanism of germination of bacterial spores[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(10): 100002.

[11] ZHANG P F, KONG L B, WANG G W, et al. Combination of raman tweezers and quantitative differential interference contrast microscopy for measurement of dynamics and heterogeneity during the germination of individual bacterial spores[J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(5): 56010.

[12] 陈越, 彭立新, 王晓春, 等. 微分干涉差显微成像方法高通量分析单个苏金云芽胞杆菌 HD-1 芽胞萌发[J]. 分析化学, 2015, 43(12): 1787-1793.

CHEN Y, PENG L X, WANG X C, et al. High-throughput investigation of germination of individual *Bacillus thuringiensis* HD-1 spores by differential interference contrast microscopy imaging [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(12): 1787-1793.

[13] ARONSON A I, SHAI Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: Unique features of their mode of action[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 195(1): 1-8.

[14] ROSAS-GARCÍA N M. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2009,

- 3(1):28-36.
- [15] HELGASON E, ØKSTAD O A, CAUGANT D A, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* — One species on the basis of genetic evidence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6):2627-2630.
- [16] SETLOW B, LOSHON C A, GENEST P C, et al. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(2):362-375.
- [17] XIE C A, LI Y Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. Journal of Applied Physics, 2003, 93(5):2982-2986.
- [18] XIE C A, LI Y Q, TANG W, et al. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy [J]. Journal of Applied Physics, 2003, 94(9):6138-6142.
- [19] PUPPELS G J, DE MUL F F, OTTO C, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy[J]. Nature, 1990, 347(6290):301-303.
- [20] TALARI A C S, MOVASAGHI Z, REHMAN S, et al. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2015, 50(1):46-111.
- [21] WANG G W, ZHANG P F, SETLOW P, et al. Kinetics of germination of wet-heat-treated individual spores of *Bacillus* species, monitored by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10):3368-3379.
- [22] ZHANG P F, GARNER W, YI X, et al. Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus* species[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(14):3608-3619.
- [23] WANG G W, YI X, LI Y Q, et al. Germination of individual *Bacillus subtilis* spores with alterations in the GerD and SpoVA proteins, which are important in spore germination[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(9):2301-2311.
- [24] SETLOW B, COWAN A E, SETLOW P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3):637-648.
- [25] VEPACHEDU V R, SETLOW P. Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(5):1565-1572.
- [26] SETLOW B, ATLURI S, KITCHEL R, et al. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β -type small acid-soluble proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11):3740-3747.

(责任编辑:米慧芝)