

趋磁细菌研究进展

孙秀兰^{1,2}, 刘伟伟¹, 张银志², 樊惠良³, 陈文君³

(1 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 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】 趋磁细菌的研究在我国起步较晚, 也少见有相关报道, 本文主要介绍国内外这一领域的研究进展, 并提到了趋磁细菌在食品检测中的应用, 旨在促进国内此工作的开展, 以便更好的开发利用这一新的环境微生物资源, 为食品检测方法的快速化多样化奠定基础。

【关键词】 趋磁细菌; 磁小体; 免疫磁珠

【中图分类号】 Q 932

【文献标识码】 A

Progress in studies on magnetotactic bacterium

SUN Xiulan^{1,2}, LU Weiwei¹, ZHANG Yin-zhi², FAN Huiliang³, CHEN Wen-jun³

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

【Abstract】 Study on the magnetotactic bacterium in our country has a late start with rare relevant reports. This paper mainly describes the research in this field at home and abroad and the role of magnetotactic bacterium in food detection is also referred. The paper aims to help to promote the ongoing work in our country. It will lay a great basis for better development and utilization of this new environmental microorganism resources in the rapid and diversified detection methods of food.

【Key words】 Magnetotactic bacterium; Magnetosome; Immunomagnetic beads

趋磁细菌 (Magnetotactic bacterium) 是一类能够沿着磁力线运动的特殊细菌, 其细胞内含有对磁场敏感的磁小体, 起了导向作用, 并且可以借助自身鞭毛来运动。这些磁小体为单磁畴晶体, 大小均匀, 微细, 无毒, 易于提取, 除成本低廉外, 最大的特点是磁珠表面生物膜厚度均匀, 与内部具磁性的铁化合物颗粒结合牢固, 不易脱落, 并且该有机生物膜易于进行化学修饰, 因此在蛋白质工程、酶工程、医疗卫生及化工等领域具有重大的应用价值。本文主要介绍国内外这一领域的研究进展, 并提到了趋磁细菌在食品检测中的应用, 旨在促进国内此工作的开展, 以便更好的开发利用这一新的环境微生物资源, 为食品检测方法的快速化多样化奠定基础。

1 趋磁细菌概述

1975年, BLAKEMORE 用显微镜研究盐泽的泥浆沉淀物时, 观察到有些微生物持续不变的向一个方向游动, 他们会聚

集在载玻片的某一边缘。如果拿一个磁铁靠近载玻片, 细菌就会向磁铁的 S 极移动, 这种奇异的微生物便是趋磁细菌。它们是一类能够在体内形成纳米磁性颗粒并能在外磁场的作用下做定向运动的细菌, 其主要分布于土壤、湖泊和海洋等水底污泥中, 一般为革兰阴性厌氧或微好氧菌。磁细菌胞内有一个独特的结构——磁小体, 是一个被磷脂膜包被的单磁畴晶体, 直径在几十纳米到几百纳米之间, 比表面积较大, 其主要构成成分包括 Fe_3O_4 、 FeS 、 Fe_3S_4 或者 FeS_2 , 它们沿细胞长轴排列成链状 (一列、多列或散列) 使细菌具有磁性, 并沿着磁力线方向移动。磁小体的形成是一个非常复杂的过程, 其中有着特殊基因的表达、包膜囊泡的形成、目标蛋白的识别、金属离子的运输和生物矿化作用^[1]。这个生命过程形成了高纯度、高均匀度、有独特结构的链状单磁畴晶体。磁小体由于有很好的生物相容性, 表面很容易进行化学修饰, 因此可以作为新一代纳米磁性材料在磁性材料、生物工程、临床医学和废水处理等许多领域有潜在的不可估量的应用前景。

2 趋磁细菌的分类

趋磁细菌是一类在地磁场的作用下沿磁力线定向运动的原核生物的总称。这类细菌具有形态学多样性、代谢多样性、

【收稿日期】 2010-12-20

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (20806033); 张家港市科技局项目 (ZKS0904)

【作者简介】 孙秀兰 (1976-), 工学博士, 副教授, 从事食品安全检测方面研究, Email: sxlzz@yahoo.com.cn

系统发生学多样性等。在细胞形态上已经发现的有:球状(接近球形或者卵状)、杆状、弧状(包括弯曲状)、螺旋状以及多细胞聚集物。因此趋磁细菌这一术语并不是分类学的定义,而是指不同种类的具有趋磁特性的细菌的总称。

根据生物矿化产物的不同,趋磁细菌可以分为两类:产生四氧化三铁矿物型趋磁细菌和产生四硫化三铁矿物型趋磁细菌。铁氧化物型趋磁细菌大多数是微好氧微生物或者兼性厌氧微生物,而铁硫化型则都是厌氧微生物。

通过对趋磁细菌一些菌株的16S rDNA序列的系统进化分析,发现趋磁细菌只存在于Proteobacteria和Nitrospina这两个类群内,其中多数位于Proteobacteria纲的 α 亚纲和 δ 亚纲,而Nitrospina中只有*Magnetobacterium bavaricum*一种趋磁细菌的存在。在最新版的伯杰系统细菌学手册中,趋磁细菌被分别归入Magneospirillum和Magnetobacterium属中,其中Magneospirillum属有两个种,即*M. magnetotacticum*和*M. gryphisvaldensis*。M. gryphisvaldensis为该属的模式种。

3 趋磁细菌的生态分布

趋磁细菌在自然界分布广泛,从自然界采集到的样品,不需要分离和培养,趋磁细菌就能检测到。在我国,趋磁细菌也是广泛分布的,《趋磁细菌的分离、纯化及生化特性研究》一文报道,从我国武汉东湖淤泥中分离出了趋磁细菌,并对其生化特性等进行了研究;范国昌等^[2]对我国黄土剖面和淡水湖泊淤泥中的趋磁细菌的形态、培养特征及磁小体的主要成分等进行了研究;贾蓉芬等^[3]报道了黄土剖面中趋磁细菌的特征和生态标志意义。章勇良等^[4]也对我国黄石磁湖淤泥中分离出的好氧趋磁细菌的形态、培养特征及磁小体物质组成等进行了研究。尽管趋磁细菌在全球都有分布,但在某个局部区域,即水环境中的氧-厌氧表面(OATZ)区域,趋磁细菌存在最高的菌数量。因为趋磁细菌是一种微好氧的细菌,实验证明,在完全除去O₂的培养液中不能生长,因此,它们适合于在江河湖海的泥沙表层生存^[5]。虽然也有报道说趋磁细菌能在空气或者完全厌氧的环境下生长,但是总的来说大多为微好氧菌,理想的生长环境含氧量在10%以下。趋磁细菌生长的最佳温度为室温(22~30℃),当环境温度低于15℃或高于37℃时,细菌生长极慢,而且当温度较高时,菌体形态会严重变形,但是也不乏有较特殊的磁细菌出现,最近美国学者LETÈVRE报道了一种生长在温泉中的趋磁细菌,其生长温度一般就在45~55℃,较常见的磁细菌耐高温。趋磁细菌大都生长在相对中性的还原环境,pH以6.5~7.2为宜;在沉积物中趋磁细菌基本上富集在水沉积物界面下1cm以内,其中以2~5mm处最多。

4 趋磁细菌的生物学特性

“趋磁细菌”没有分类学的意义,代表了苛求复杂营养的原核生物和一个异族,包含了许多细胞形态,例如球菌、杆菌、弧菌、螺旋菌以及多细胞聚集体^[7]。虽然趋磁细菌有个体差异,但某些生物学特性具有相似性:都是细菌域革兰阴性菌(可能包括一些具有趋磁性的古细菌域的菌株,但是还没有明确的报道);都具有运动特性,通常借助于鞭毛进行运动(但也不排除不运动但是能合成磁小体的细菌存在,精确的说,这类细菌具有磁性但不具备趋磁性);都对生长环境中氧的含量敏感;所有报道的纯培养菌株都是呼吸代谢方式(未见到有发酵代谢方式的趋磁菌株报道);都含有明显的标志物——磁小体。磁细菌体内磁小体的合成受多种因素的影响,总体来说它的合成是受基因控制的^[8],相应的形成具有磁性的铁化合物,从而能够沿着磁力线运动。在北半球分离到的趋磁细菌会沿磁力线向地理北极(即地磁南极S)游动,在南半球趋磁细菌则趋向地理南极(即地磁北极N);在赤道附近既有趋向S极,也有趋向N极的^[9]。趋磁细菌属于化能异养,利用三羧酸循环的中间体和醋酸盐等作为生长的碳源,一般不利用碳水化合物;利用硝酸盐和铵盐作氮源,趋磁细菌对营养要求苛刻,难以培养,难以分离纯化。

5 趋磁细菌的分离

趋磁细菌的分离方法多种多样,但是其原理都是基于这种细菌在磁场中的趋向运动。在《磁性细菌的电磁诱导分离及人工培养》^[10]一文中曾经提出利用电磁诱导的方法来分离趋磁细菌,电磁诱导分离用的工具以电磁学“载流螺旋管产生磁场”的原理设计,螺旋状导线加载电流后产生磁场,螺旋管的两端便会出现磁极现象,从而会对趋磁细菌有感应,将趋磁细菌分离出来。还有报道是用磁泳法分离细菌,其原理就是将细菌混合液放在磁场环境中,趋磁细菌会向相应的磁场一极泳动从而得到分离纯化。总的来说,目前利用的方法大都集中在利用外加磁场对细菌进行分离。

6 趋磁细菌的培养和纯化

关于趋磁细菌的培养和纯化已有一些相应的报道,但是该领域的进展却相当缓慢,一部分原因是人们分离并且纯培养的菌种较少,另一个原因是多数趋磁细菌对培养条件要求苛刻,培养技术复杂,而且对磁小体的形成机制尚不清楚,这些都限制了对趋磁细菌的研究。在趋磁细菌的培育中,磁小体合成的多少对我们来说至关重要,有很多因素会影响磁小体的合成,综合起来讲,氧浓度、铁源、氮源、碳源及矿物质对磁小体合成的影响最大。

氧浓度是影响磁小体合成的关键因素之一,过高的氧气浓度在某种程度上会促进趋磁细菌的生长繁殖,但是却会抑制甚至丧失磁小体的合成能力。培养液中低浓度的氧或者无

氧是磁小体合成的必要条件。影响磁小体合成的机制尚不清楚,有报道认为,其能可逆的抑制铁还原酶的活性。磁小体形成过程中氧和铁的同位素失踪表明, Fe_3O_4 分子中的 O 不是来自 O_2 ,而是来自 H_2O ,说明 O_2 并未直接参与 Fe_3O_4 的合成。关于 O_2 影响磁小体合成原因,目前比较一致的看法是,氧作为呼吸链的终端电子受体,产生能量供磁小体的合成。在有硝酸盐存在的培养基中,细胞在厌氧条件下也合成磁小体,说明与磁小体合成相关的酶系不是氧诱导产生的,但磁小体合成的酶系可能对氧敏感。有文献报道^[11],在静置培养时,随着氧浓度的增加 WD-1 的生长量增加,但有利于磁小体合成的氧分压范围为 1.58~3.95 kPa 即氧浓度为 1.56%~3.9%,此时 WD-1 胞内磁小体数量明显增加,但当通气培养时,菌体明显降至 0.79 kPa 处理组的水平。但是菌株不同,合成磁小体所需要的氧分压也不同。

由于磁小体的组成成分为 Fe_3O_4 ,因而铁源的种类和浓度必然会影响它的合成。目前趋磁螺菌是优先利用 Fe^{3+} 还是 Fe^{2+} 还没有定论。YANG 等^[12]指出, FeSO_4 对磁小体的合成有促进作用且 Fe^{2+} 进入细胞不需要耗能,其利用没食子酸铁与 FeSO_4 产生的磁小体相当, *Magnetospirillum* sp. AMB-1 利用 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 都能较好的合成磁小体。但在自然情况下, Fe^{2+} 不稳定,容易氧化成 Fe^{3+} ,在碱性条件下 Fe^{3+} 的溶解度低,容易沉淀,因此在以 Fe^{3+} 为铁源的培养基中通常加入铁螯合剂如奎尼酸、柠檬酸等。但同时也指出,其不能较好的利用螯合后的化合物如 Fe-Quinate 、 Fe-Citrate 利用自由铁盐时,最终的磁小体产量较高。关于培养基中铁源的浓度,各研究小组使用浓度不一,但可以肯定,在培养基中铁浓度达到 30 $\mu\text{mol/L}$ 之后,随着铁浓度的增加,细胞对铁の利用速度和细胞的磁小体产量没有明显的增加。因此可以采用分批补铁的策略以提高磁小体的产量^[13]。

对于氮源,趋磁细菌在以 NH_4Cl 或硝酸钠为氮源的培养基中都能合成磁小体,而对于碳源,趋磁细菌可以在含乙酸钠、琥珀酸钠、乳酸钠及苹果酸等碳源的培养基中合成磁小体,但是碳源的种类影响细胞内磁小体的数量。对于矿质元素, Zn^{2+} 浓度与磁小体形成直接相关,铁还原酶的活性明显受 Zn^{2+} 影响。

然而,趋磁细菌的大量培养仍然存在三个问题需要解决:(1)培养周期长。培养时间最短的为 50 h 最长的达 10 d 之久;(2)由于所用培养基中碳、氮源浓度的限制,致使培养的密度不高,磁小体产量低;(3)细胞密度和磁小体产量之间的关系有待于进一步协调,在某些条件下细胞密度得到了明显提高,但磁小体产量并不随之增加。

7 磁小体的提取

磁小体因为其特殊性质而在许多领域有广泛的应用前景,对磁小体的应用研究的首要问题就是如何简单、高效的得到纯净的磁小体。磁小体的提取和纯化方法很多,一般的方法步骤如下:(1)超声波破碎趋磁细菌的细胞壁在冰浴条件下,超声波破碎趋磁细菌的细胞,使胞内磁性颗粒释放出来,然后通过磁铁吸取收集磁性颗粒。文献《趋磁细菌的分离与培养和磁小体纯化技术研究》报道,经过 10 min 超声波破碎后,可以看到菌悬液还有部分浑浊,细胞没有完全破碎,在破碎液中有肉眼可见的细小黑色颗粒出现。为了完全破碎细胞,继续破碎。20 min 后,菌悬液变澄清,此时可以看到直径大约为 2 μm 的黑色片状物出现。用磁铁进行吸附,黑色片状物具有很强的磁性,因此可能是磁小体的聚集物。经过离心后,比重较大的细胞碎片、未破碎的细胞和聚集的磁性颗粒都被离心到沉淀中;取上清液用透射电子显微镜观察。观察过程中,因为磁小体膜被破坏,很难观察到单个的磁小体,大部分都聚集在一起。

报道的另外一种方法是 SDS 直接裂解法。在不同条件下处理的结果表明,2% SDS 裂解趋磁细菌时,在 3 个时间梯度中都有较大的黑色磁性颗粒出现,同时在 15 min 组还有大量的细胞未被裂解。在使用 1% 的 SDS 进行裂解时,15 min 组有大量的细胞未被裂解,磁小体悬浮液中磁小体的浓度很低;45 min 组细胞裂解得比较充分,但是磁小体聚集现象严重;30 min 组的效果最好,细胞裂解得比较充分,磁小体聚集现象又比较轻微。趋磁细菌被裂解后的细胞碎片和未裂解的细胞在低速离心的过程中被除去,磁小体颗粒和少量的细小碎片悬浮在溶液中。经过磁铁吸附后,有磁性的磁小体被吸附到磁铁一侧,将靠近磁铁一侧的溶液小心吸出后,即可以得到纯度较高的磁小体。并且可以发现,大多数磁小体紧密相连,排成一列,小颗粒的直径大约为 50 nm,呈不规则的球状;此外还有比较大的颗粒,直径大约为 100~150 nm,可能在裂解的过程中,磁小体的膜被 SDS 破坏,磁小体发生聚集而形成的颗粒。

(2)蔗糖密度梯度离心分离磁性颗粒和细胞碎片:由于磁性颗粒内含有 Fe_3O_4 晶体,因此需要提高蔗糖的浓度。选择了 70% 和 80% 两个浓度的蔗糖溶液作为离心介质,每次离心的条件为:20 $^\circ\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min,如上样量较大时,可选择增加离心次数的方法,分批回收磁性颗粒带。

(3)用超声波打散与缓冲液洗涤磁性颗粒,以除去磁性颗粒表面所吸附的物质:细菌纳米磁性颗粒小,易吸附其他物质,因此在破壁后,尚有部分细胞碎片粘附在磁性颗粒表面。这些碎片必须去除。实验表明,超声波打散洗涤法,能够有效的将这些磁性颗粒表面所吸附的物质除去。在洗涤过程中也

发现,随着洗涤次数的增加,悬浮液中的颗粒肉眼可见度逐渐降低,直至完全分散,悬液呈透明状态。

(4)倾去上清液,加缓冲液后保存。

8 免疫磁珠的制备

磁小体是一种优良的载体,通过一定的方法在磁小体表面偶联上抗体、抗原或者其他基团可以成为有免疫活性的磁性物质,即为免疫磁珠。关于免疫磁珠的制备方法,已经有很多报道,在《抗体包被免疫磁珠的研制及其应用》^[14]中提到一种简单的方法,即为:向磁性微球悬液中加入丙烯醛,经⁶⁰Co或电子加速器照射使微球表面形成一层活性膜后,与抗体共同孵育一定时间,再以MPC磁力架回收磁珠,即为免疫磁珠。在免疫磁珠的制备过程中,根据磁珠表面活性物质的不同,要对磁珠进行不同方面的修饰,比如磁性颗粒的氨基化修饰,磁性颗粒的醛基化修饰^[15],然后将磁珠对抗体进行饱和吸附。

9 免疫磁珠法在食品检测中的应用

趋磁细菌可以在体内产生纳米级的磁小体,经过修饰的磁小体有一定的生物活性叫做免疫磁珠。免疫磁珠法是近三十年发展起来的一项免疫学检测技术。利用趋磁细菌产生的免疫磁珠一般是以分离出来的磁小体为载体,将抗体或抗原包被在磁珠表面(即免疫磁珠),免疫磁珠可以与相应的抗原或抗体发生特异性结合反应。由于免疫磁珠的磁性,人们可利用非常简易的外加磁场(如普通磁铁)高效、简便、快速的分离和收集反应后的免疫磁珠,然后再检测结合于免疫磁珠表面的目标抗原或抗体。由于免疫磁珠的抗原/抗体反应是在其颗粒表面而非在匀相液中进行,故经免疫磁珠的分离和收集,实质上起了提纯、富集目标抗原或抗体的作用,从而明显提高后续检测的敏感性和特异性。在食品中存在的一些致病微生物、农兽药残留、真菌毒素严重影响人们的饮食安全,因此快速检测食品中是否存在这些对人体有害的物质是食品检测领域的一大任务,制备这些有毒有害物质的抗原或者免疫动物之后产生抗体,可以利用免疫磁珠法进行快速检测。这是食品检测领域的一大新的突破,为快速检测方法的建立奠定了基础。

10 趋磁细菌研究展望

趋磁细菌的发现和研究的,大大的丰富了微生物学、生物化学、古生物学及生物进化等许多学科的研究内容,同时极大地促进了交叉学科的交融和发展。尽管人们对趋磁细菌的形态结构和特性等方面进行了大量的研究,但是在磁小体的合成及其调节,趋磁细菌的生物学意义的探讨等方面还不够成熟,有待于进一步研究。磁细菌的应用领域也是随着研究的深入

在不断拓宽的,它可以作为酶、药物和核酸载体用在生物医药领域;可以作为新一代的磁性材料用在信息记录领域;同时可以制备磁化细胞从而在发酵、食品、生物等领域都有很大用途。总之,生命在磁场中进化,研究趋磁细菌必将为人们探索生命现象提供有力的参考。

【参考文献】

- [1]陈龙,王国斌.趋磁细菌纳米磁小体的培养与分离及其在医学上的应用进展和前景[J].现代医学研究进展,2008,8(7):1327-1328
- [2]范国昌,李荣森,李小刚,等.我国趋磁细菌的分布及其磁小体的研究[J].科学通报,1996,41(4):349-352
- [3]贾蓉芬,彭先芝.中国黄土剖面趋磁细菌的组成特征与生态意义[J].岩土矿物学杂志,2001,20(4):428-432
- [4]章勇良,卫杨保.好氧趋磁细菌HM-1的分离及生物学特性研究[J].武汉大学学报,1997,43(6):775-780
- [5]刘信.向磁微生物的开发和利用[J].微生物学通报,1991,18(3):188-189
- [6]LEFÈVRE C T, ABREU F, FRANKEL R B, et al Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada[J]. Appl Environ Microbiol 2010, 76(11): 3740-3743.
- [7]CHAVADAR M S, SHYAM S, BAJEKAL S S Magnetotactic bacteria from Lonar lake[J]. Curr Sci 2009, 96(7): 957-958
- [8]RICHARD B, FRANKEL, DENNIS A, et al How magnetotactic bacteria make magnetosomes quiet up[J]. Trends Microbiol 2006, 14(8): 330-331
- [9]李文兵.趋磁细菌的磁小体[J].中国生物工程杂志,2005,25(7):21-27.
- [10]解宇,汪浩.磁性细菌的电磁诱导分离及人工培养[J].杭州师范学院学报(医学版),2007,27(4):218-221
- [11]姜伟.趋磁细菌的特点及其纳米磁小体的合成条件[J].中国农业科技导报,2007,9(3):24-31
- [12]YANG C D, TAKEYAMA H, TANAKA T, et al Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of lipase bacterial magnetic particle complex by recombinant magnetospirillum magnetium AMB-1[J]. Enzyme Microb Technol 2001, 29(1): 13-19.
- [13]刘艳丽.趋磁细菌的分离与培养和磁小体纯化技术研究[D].中国科学院研究生院,2005.
- [14]王东升,张岩,吕平,等.抗体包被免疫磁珠的研制及其在细胞与分子免疫学杂志,2001,17(30):296-297
- [15]何磊,郭雅飞.免疫磁珠的制备[J].化工时刊,2008,22(7):5-7