

蜡样芽孢杆菌的二阶导数红外光谱研究

万佳蓉¹, 马美湖^{1*}, 周传云¹, 聂明²

1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128
2. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘要 采用傅里叶变换红外光谱非破坏性地分析了蜡样芽孢杆菌, 在获得完整全细胞组分的红外光谱信息基础上, 进行了二阶导数光谱转换。结果表明, 根据二阶导数光谱特征吸收峰可区分蜡样芽孢杆菌细胞的荚膜、芽孢、贮能物质等特殊结果物质。以 1654 cm^{-1} 附近的 α -螺旋结构的蛋白酰胺带吸收峰与在 1601 和 1403 cm^{-1} 附近显示的强羧基伸缩振动吸收峰可探测到细胞荚膜结构; 根据 $1617, 1372$ 和 1569 cm^{-1} 附近的吡啶二羧酸(DPA)的吸收峰可认定细胞内芽孢的存在; 此外, 可在二阶导数红外谱图中同时找到多聚-羟基丁酸(PHB)细胞粒、荚膜、芽孢的吸收峰。由二阶导数红外光谱可分辨重叠光谱来探测细胞多种结构物质, 为从分子生物学与细胞生物学角度, 为研究蜡样芽孢杆菌提供参考信息。

关键词 红外光谱; 二阶导数; 蜡样芽孢杆菌; 荚膜; 芽孢

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)05-0904-03

引言

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是引起食物中毒的常见病原菌, 为需氧性、有运动性、能产生芽孢的革兰氏阳性大杆菌, 在自然界分布极广, 空气、土壤、尘埃、水和腐烂草中均有存在。由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒多发生在夏、秋两季, 引起中毒的食品常由于食前保存温度不当(26~37℃)且放置时间较长, 使食品中的蜡样芽孢杆菌得以生长繁殖, 产生致吐肠毒素和致腹泻肠毒素, 引起人胃肠功能紊乱。此菌营养体在100℃经20 min可被杀死, 但其芽孢在120℃, 经1 h才能被杀死^[1,2]。因此, 研究蜡样芽孢杆菌细胞结构是研究其传染病防治与控制中不可缺少的一个重要环节。

蜡样芽孢杆菌的细胞结构中包含有荚膜、芽孢、贮能物质等特殊的细胞结构, 是传染病传播与致病的重要因素。采用红外光谱(素有“分子指纹”^[3]之称)的分析方法, 能够迅速找到这些结构所含的特征化学成分的吸收峰, 从而确定这些特殊结构的存在与形式, 为微生物分子与细胞学以及分类学提供重要的参考信息。而且在分析的过程中不需要破坏细胞与添加任何化学试剂, 极大的提高了真实性和降低了分析成本^[4~6]。

本文在获得了分辨率高、重现性好的红外谱图的基础

上, 并经过二阶导数光谱转换, 得到蜡样芽孢杆菌的二阶导数红外光谱图。详细研究了蜡样芽孢杆菌红外吸收二阶导数图谱, 探讨了红外光谱在蜡样芽孢杆菌的特殊结构的特征光谱。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

蜡样芽孢杆菌为湖南农业大学食品科技学院微生物教研室提供, 溴化钾、蛋白胨、牛肉膏、氯化钠等化学试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

Nicolet Avatar-370型傅里叶变换红外光谱仪(美国热电公司); FD-3型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); SH2-B型水浴恒温振荡器(上海浦东物理光学仪器厂); SS325型高压灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司); LRH-250A型生化培养箱(广东省医疗器械厂); AE200型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); HD-925型超净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); DD5型大容量多管离心机(长沙英泰仪器有限公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 蜡样芽孢杆菌的培养

采用营养肉汤培养液培养^[7]。500 mL三角瓶装入200 mL培养液, 接种经活化三代的蜡样芽孢杆菌三环。置于往

收稿日期: 2006-01-10, 修订日期: 2006-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270976)资助

作者简介: 万佳蓉, 女, 1982年生, 湖南农业大学食品科学硕士研究生

*通讯联系人

e-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

复式摇床上培养, 往复频率为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 培养温度为 (37 ± 1) 。

1.2.2 菌体的收获与处理

将培养 1 d 的营养肉汤发酵液 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 获得菌体, 然后用 0.9% NaCl 溶液洗涤 3 次。冷冻干燥后装安培瓶置于干燥器中, 4℃ 下保藏备用。

1.2.3 红外光谱测定

取少量菌体掺入溴化钾压片测定红外光谱。光谱测量范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 信号扫描累加 64 次, 得到菌体的红外光谱, 经 OMNIC5.1 软件进行二阶导数转换处理。

2 结果与讨论

2.1 荚膜

荚膜(Capsule)是包裹在单个细胞壁上有固定层次, 具有一定厚度的透明胶状物质, 其化学组成主要是多肽、蛋白质、多糖、脂类、脂蛋白、脂多糖等。荚膜是细胞外碳源和能源性贮藏物质, 可保护细胞免受干燥的影响, 能增强某些病原菌的致病能力, 使之抵抗宿主吞噬细胞的吞噬^[7]。如图 1 所示, 蜡样芽孢杆菌的二阶导数红外谱图中在 1601 和 1403 cm^{-1} 附近显示出反对称和对称的羧基伸缩振动吸收峰, 在 1654 cm^{-1} 附近吸收峰为缔合态的蛋白酰胺带吸收峰呈现出的 α -螺旋结构。另外在 1552 cm^{-1} 附近的吸收峰为多肽的酰胺带, 而 1451 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C—H 甲基、亚甲基的弯曲振动。这些特征吸收峰都表示酸性寡肽或多肽的存在。事实上, 多聚谷氨酸形成的 α -螺旋结构被认为是在 1654 cm^{-1} 处引起吸收峰的原因^[8], 它的氨基酸侧链羧基分别在 1601 和 1403 cm^{-1} 附近有一个吸收峰。这种具有多肽荚膜结构的特征光谱在芽孢杆菌属, 如: 枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌的光谱图中均同样存在^[9,10]。

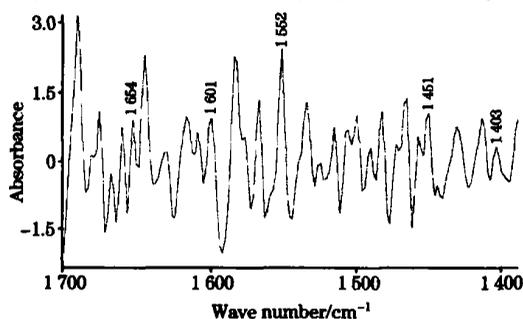


Fig 1 Second derivative FTIR of capsule

2.2 芽孢

芽孢(Endospore)是蜡样芽孢杆菌在其生长发育后期, 在细胞内形成的一个圆形或椭圆型、壁厚、含水量低、抗逆性强的休眠构造^[7]。芽孢最主要的特点就是抗性强, 对高温、紫外线、干燥、电离辐射和很多有毒的化学物质都有很强的抗性。细菌在产生芽孢的过程中, 生芽孢的细胞大量吸收钙离子, 并大量合成营养细胞中没有的吡啶二羧酸(DPA)。在成熟的芽孢中, 芽孢原生质体含有极高的吡啶二

羧酸钙(DPA-Ca), 在新合成的、具有特殊化学构造的外层(皮层和芽孢衣, 有时还有芽孢外壁)中也有这种物质。芽孢的壁含有一种特殊的肽聚糖, 所有芽孢基本上都一样, 但与营养细胞的细胞壁肽聚糖却不一样。图 2 为蜡样芽孢杆菌的二阶导数光谱图。在 $1281, 773, 724, 709, 658 \text{ cm}^{-1}$ 附近存在一系列相关的振动吸收峰。将此菌液用孔雀绿染色, 在显微镜下观察发现有大量的成熟芽孢。芽孢内含物 DPA 的特征光谱图在图 2 中表现出了高密度的吸收峰。螯合了钙离子的 DPA 所产生的两个 COO^- 基团的伸缩振动吸收峰, 分别位于 1617 和 1372 cm^{-1} 附近。而在 1569 cm^{-1} 附近的额外吸收峰是由 DPA 环中 C—N 键所引起的。芽孢谱图可清晰显现出 DPA 特征吸收峰, 而芽孢壁多肽由于其种类繁多而没有确切的吸收峰表示, 这可能是由于其蛋白总量较稳定所引起的。由此推断, 红外光谱技术也可以用来呈现芽孢的形成过程。

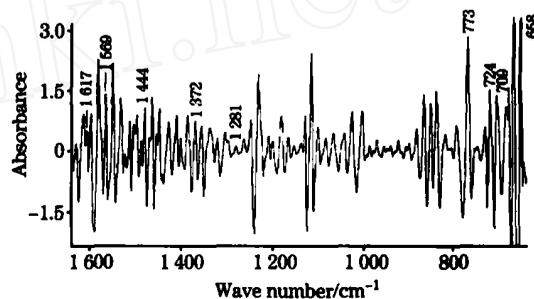


Fig 2 Second derivative FTIR of endospore

2.3 多种结构的同时检测

蜡样芽孢杆菌的红外光谱图表明, 可以同时表达多聚-羟基丁酸粒(PHB)、芽孢和荚膜的特征吸收峰。图 3 中的光谱表示荚膜和 DPA 的吸收峰如前所述。在 1740 cm^{-1} 附近有一个很明显的酯基吸收峰, 是 PHB 的主要特征吸收峰^[10,11]。另外 2 个较强吸收峰在 1601 和 1403 cm^{-1} 附近, 显现出荚膜和(或)芽孢的存在。其他特征吸收峰清晰地表明是 DPA, 但是较微弱, 这不仅可推论出 PHB 和荚膜的同时存在, 而可知 PHB 的减少表明芽孢开始形成。

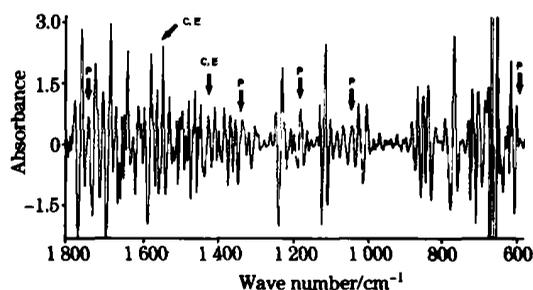


Fig 3 Second derivative FTIR of bacillus cereus

C: Capsule; E: Endospore; P: PHB

3 结论

综上所述, 红外光谱是一个非常有价值的在整个细菌生长周期内探测蜡样芽孢杆菌细胞结构的工具。将光谱进行二

阶导数转换,可以消除波长一次项的误差,且可以比较容易分辨出强峰上的小肩峰,使红外光谱中隐含的信息突出^[12],从而使蜡样芽孢杆菌细胞内的各种特殊结构物质存在与形式(如贮藏物质的积累与利用,芽孢、荚膜和粘液物质的形成

等生物学过程)能更直接地被显现出来。此外,红外光谱技术可以用来替代传统染色方法来观察微生物细胞结构。可以设想通过实践积累,此分析方法还可能运用于其他类似微生物的研究。

参 考 文 献

- [1] WANG Da-si(王大耜). Base of Bacterial Taxonomy(细菌分类基础). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1977.
- [2] Gordon R E. The Genus Bacillus(芽孢杆菌属). Beijing: Agriculture Press(北京: 农业出版社), 1983.
- [3] Mareike W, Herbert S, Siegfried S. Appl. Envir. Microbiol., 2002, 68(10): 4717.
- [4] Royston G, Eadaoin M T, Paul J, et al. FEMS Microbiol.Lett., 1996, 140: 233.
- [5] Goodacre R, Timmins E M, Burton R, et al. Microbiol., 1998, 144: 1157.
- [6] Ngothi N A, Kirschner C, Naumann D. J. Mol. Struct., 2003, 662: 371.
- [7] ZHOU De-qing(周德庆). Essential Microbiology(微生物教程). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2002.
- [8] Dieter H, Dieter N. FEMS Microbio. Lett., 1995, 126: 75.
- [9] Costeron J W, Lewandowski Z, DeBeer D, et al. J. Bacteriol., 1994, 176: 2137.
- [10] Hussain M, Wilcox M H, White P J. FEMS Microbial. Rev., 1993, 104: 191.
- [11] Helm D, Labischinski H, Schallehn G, et al. Microbial., 1991, 137: 69.
- [12] CHENG Cun-gui, YING Tao-kai(程存归, 应桃开). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 36.

Second Derivative FTIR Spectroscopic Study of Bacillus Cereus

WANG Jia-rong¹, MA Mei-hu^{1*}, ZHOU Chuan-yun¹, NIE Ming²

1. Faculty of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China
2. College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract Some particular cell components of intact *Bacillus cereus* could be detected and identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR were collected directly, then the FTIR spectra of the samples were converted into second derivative spectra. Typical marker bands were used to identify these bacterial cell components such as capsules, endospores or storage materials. Capsules were detected in cell by a strong amide band near $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$ typical for α -helical structures and by strong carboxylate stretching vibrations ($1\ 601\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 403\ \text{cm}^{-1}$, respectively). The formation of endospores was discovered using marker bands for dipicolinic acid (located at $1\ 617\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 372\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 569\ \text{cm}^{-1}$). Spectra of this strain showed expression of poly- γ -hydroxybutyric acid granules, capsules and endospores simultaneously. These bacterial cell components can be identified by second derivative FTIR spectroscopy which can distinguish the overlap spectrum. And that offered some referenced information for molecular biology and cellular biology.

Keywords Fourier transform infrared spectroscopy; Second derivative; *Bacillus cereus*; Capsule; Endospore

(Received Jan. 10, 2006; accepted Apr. 18, 2006)

*Corresponding author