

枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应甲醛胁迫过程的拉曼光谱研究

程 琴^{1,2} 董 蓉^{1,3} 黄大林⁴ 黄庶识^{1,2*} 陈丽梅²

¹广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007
²昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650224
³广西师范大学生命科学院, 广西 桂林 541004
⁴桂林医学院微生物与免疫学教研室, 广西 桂林 541004

摘要 为了探究枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应甲醛胁迫过程的生理反应及其耐受甲醛机理, 利用激光光镊拉曼光谱(LTRS)系统研究不同浓度甲醛胁迫萌发后孢子 2 h 的响应过程。结果显示, 营养细胞和萌发后孢子对甲醛都具有耐受能力, 但萌发后孢子对不同浓度甲醛胁迫产生的生理响应效应不同; 当萌发后孢子在不含甲醛的培养基中生长时, 与生物大分子相应的特征峰强度增加先经历 0~0.5 h 的延缓期, 接着 1.5~2.0 h 是一个快速上升的过程; 当分别用 0.4, 0.8 和 1.0 mmol/L 甲醛胁迫萌发后孢子时, 相应特征峰强度都有一个先上升后下降的过程, 峰强下降的时间拐点分别是 1.5, 1.0 和 0.5 h。光谱分析结果表明, 0.4 mmol/L 甲醛的胁迫会对细胞造成轻度伤害; 0.8 mmol/L 甲醛胁迫会抑制孢子 DNA 的复制, 造成膜脂碳氢链断裂; 1.0 mmol/L 甲醛胁迫时, 细胞在 0.5 h 内对甲醛产生了剧烈的胁迫响应, 导致生物大分子含量在 0.5~2.0 h 内严重下降, 细胞受到严重伤害。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 单细胞分析; 枯草芽孢杆菌; 萌发后孢子; 甲醛胁迫

中图分类号 O657.37; Q935 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL201138.1015002

Raman Spectrum of Germinated Spores of *Bacillus Subtilis* in Response to Formaldehyde Stress

Cheng Qin^{1,2} Dong Rong^{1,3} Huang Dalin⁴ Huang Shushi^{1,2} Chen Limei²

¹Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

²Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224, China

³College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

⁴Department of Microbiology and Immunology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China

Abstract In order to explore the physiological response and tolerance mechanism of *Bacillus subtilis* after exposure to formaldehyde, laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) is employed to perform the experimental process in which germinated spores (g. spores) are stressed with different concentrations of formaldehyde for 2 h. The results show that both vegetative cells and g. spores have tolerance to formaldehyde, but the growth and physiological effect of g. spores stressed by different concentrations of formaldehyde are dissimilar. A lag phase of characteristic spectrum involved with various biomacromolecules is observed while g. spores are exposed to 0 mmol/L of formaldehyde medium from 0 to 0.5 h, subsequently, the Raman spectra peaks tend to rapidly ascend from 0.5 to 2.0 h. Characteristics and trend of Raman spectra variation are all from ascending to descending while g. spores

收稿日期: 2011-05-09; **收到修改稿日期:** 2011-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(30860010, 30970263)和广西自然科学基金(桂科回 0832006)资助课题。

作者简介: 程 琴(1984—), 女, 硕士研究生, 主要从事光谱学与分子生物学等方面的研究。

E-mail: chengqin413@163.com

导师简介: 陈丽梅(1964—), 女, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail: chenlimeikm@yahoo.com.cn

* 通信联系人。E-mail: hshushi@gxas.cn

are exposed to 0.4, 0.8, and 1.0 mmol/L of formaldehyde medium respectively for 2 h, and the corresponding inflexion of Raman spectra causes various components *in vivo* to decline where the time points are 1.5, 1.0, and 0.5 h, respectively. The analytic results of Raman spectra display that various components *in vivo* decrease gradually after 1.5 h while *g.* spores are stressed by 0.4 mmol/L of formaldehyde, implying that *g.* spores are harmed mildly. While *g.* spores are in 0.8 mmol/L formaldehyde medium, the band of nucleic acid decreases slowly at the very start, indicating that DNA cannot duplicate in the whole process. The bands of membrane phospholipids and C—S (protein) stretching mode descend obviously after formaldehyde stress for 0.5 h, which suggested formaldehyde could break down the membrane lipid hydrocarbon chains. While *g.* spores are in 1.0 mmol/L of formaldehyde medium, the high formaldehyde concentration makes a severe stress effect on cells, the content of biological macromolecules drops significantly after 0.5 h leading to cells deterioration gradually.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; single cell analysis; *Bacillus subtilis*; germinated spores; formaldehyde stress

OCIS codes 300.6450; 180.5655; 140.7010; 140.3550; 170.1530; 170.1420

1 引 言

核酮糖单磷酸(RuMP)途径是存在于许多甲基营养菌中的甲醇、甲酸、甲胺和甲醛等一碳化合物的碳同化途径^[1]。6-磷酸己酮糖合成酶(HPS)和6-磷酸果糖异构酶(PHI)是RuMP途径的两种关键酶,这两种酶普遍存在于甲基营养菌中。然而,在含甲醛的培养基上生长时,非甲基营养菌枯草芽孢杆菌可以诱导HPS和PHI的表达^[2],同时,编码这两种酶的任何一个基因受损,都会导致对甲醛中毒敏感;洋葱伯克氏菌(*Burkholderia cepacia* TM1)以香草醛为碳源生长时,通过氧化去甲基化反应产生甲醛诱导HPS和PHI酶的表达,将甲醛转变为细胞组分,表明RuMP途径并不仅存在于甲基营养细菌中,也存在于在非甲基营养菌中,枯草芽孢杆菌的RuMP途径可被甲醛诱导行使脱毒功能^[3~5]。但是,非甲基营养菌同化甲醛的机制还不完全清楚。

芽孢杆菌的孢子(内生孢子或称芽孢)是由芽孢杆菌营养细胞形成的对热、辐射和化学试剂等有很强抗性的休眠体。2,6-二羧酸吡啶(DPA)约占整个孢子干重的10%左右,在孢子抗性和稳定性方面有很重要的作用^[6],孢子一旦失去DPA就会变得非常不稳定而失去抗性^[7]。孢子对外界环境甚为敏感,一旦其探测到外部存在适宜萌发的条件,激发孢子的萌发,接着启动一连串萌发事件发生,包括DPA释放,接着孢子核心含水量提高,孢子核内蛋白质恢复流动性,酶的活性也得到恢复,这时孢子失去其休眠特性,抗性跟着丧失^[8],这时的孢子称之为萌发后孢子(*g.* spore);孢子也能对一些称之为萌发剂的营养性物质如丙氨酸、嘌呤核苷等产生响应而触发其萌发;萌发后孢子如果有后续的营养物质供应,就会启动孢子后续的一系列代谢活动,随后是细胞大分子物质如RNA、蛋白质、DNA等的合成,最后转到

细胞的出芽生长阶段,逐渐生长成一个新的营养细胞。尽管孢子在结构和化学成分上均有别于营养细胞,但其含有与营养细胞一样的遗传物质及功能性蛋白质,所以萌发后的孢子能否被甲醛诱导表达HPS和PHI仍不清楚。

激光光镊拉曼光谱(LTRS)系统是共焦显微、光学陷阱和拉曼光谱分析联用的技术,LTRS能够通过聚焦的激光束俘获悬浮在液体中的单个细胞或亚细胞器收集其拉曼光谱,从而获得单个孢子的生物化学成分,也能够动态监测该孢子由于外界环境变化导致内部生理生化的变化。由于拉曼光谱技术能无损伤、无入侵地分析研究对象,具有高度灵敏性的独特优势,在血液学^[9~13]、肿瘤学^[14]、微生物学^[15]等生物医学领域得到广泛应用。本文应用LTRS系统作为研究工具,实时记录枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应不同浓度甲醛胁迫过程的拉曼光谱,通过这些光谱数据,分析萌发后孢子生物大分子光谱振动频率和强度变化的特征,从分子水平深入探讨枯草芽孢杆菌细胞同化甲醛过程中体内物质含量的变化规律,为阐述非甲基营养菌同化甲醛代谢机理提供线索,也为探索微生物代谢甲醛机制研究提供一种分析方法。

2 材料与方法

2.1 孢子的培养和制备

菌株为枯草芽孢杆菌菌株(CGMCC1.107),购自中国普通微生物菌种保藏中心。培养基为2×SG培养基,每升含16 g 营养肉汤NB,0.5 g MgSO₄·7H₂O,2 g KCl,琼脂17 g,pH值7.0,经高温高压灭菌20 min,冷却至55℃后再加入1 mmol/L的Ca(NO₃)₂,0.1 mmol/L的MnSO₄,1 mmol/L的FeSO₄及质量分数为0.1%的葡萄糖。

枯草芽孢杆菌画线接种到 $2 \times \text{SG}$ 平板上, 28°C 培养 15 天, 收获孢子。从平板上刮下孢子放入无菌水洗两次, 再用无菌磷酸盐缓冲液 (0.03 mol/L , pH 值 7.2) 洗两次, 其间 5000 g 离心 5 min , 沉淀物加无菌磷酸盐缓冲液 (0.03 mol/L , pH 值 7.2) 配成 10^9 spore/mL 芽孢悬液, 置 4°C 冰箱避光保存待用。

2.2 萌发后孢子的制备

取 2.1 节制备的细菌孢子稀释至 10^7 spore/mL 的芽孢悬浮液, 70°C 激活处理 30 min 后, 0°C 冰水中冰浴 15 min , 加入 10 mmol/L 丙氨酸溶液, 37°C 孵育 2 h 左右, 在相差显微镜下观察 99% 以上孢子失去折光性完全变黑时, 表明这些孢子完全释放 DPA 完成萌发, 形成萌发后孢子, 停止孵育, 5000 g 离心 5 min , 无菌磷酸盐缓冲液 (0.03 mol/L , pH 值 7.2) 清洗两次, 去上清液, 沉淀物用磷酸缓冲液悬浮, 4°C 避光保存, 备用。

2.3 营养细胞和萌发后孢子吸收与耐受甲醛能力的测定

2.3.1 耐受甲醛能力测定

将营养杆菌细胞和制备好的萌发后孢子, 根据光学密度 (OD) 值, 算出每毫升营养细胞和孢子数, 分别梯度稀释后涂在含有不同浓度 ($0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0$ 和 1.5 mmol/L) 甲醛的 $2 \times \text{SG}$ 培养基平板上, 每个浓度三个平行对照, 28°C 培养 24 h , 菌落计数, 分别除以 0 浓度甲醛处理组的菌落数, 计存活率。

2.3.2 吸收甲醛能力测定

分别将 OD 值一样的萌发后孢子和营养细胞菌体放入体积为 10 mL , 浓度为 0.6 mmol/L 的甲醛溶液中, 每个样品重复 3 次, 以没有放细胞的甲醛溶液作对照, 分别在 $3, 6, 9$ 和 12 h 取出 $600 \mu\text{L}$ 菌液, 离心去菌体, 菌液稀释 10 倍与 Nash 试剂按物质的量比 $1:1$ 混匀, 30°C 保温 30 min , 测 410 nm 处 OD 值, 再根据标准曲线计算出处理液残存甲醛浓度。

2.4 萌发后孢子拉曼光谱测定

2.4.1 LTRS

实验系统如文献[15]描述, 由尼康倒置生物显微镜 (TE2000U, Nikon) 配备波长为 780 nm 的半导体激光器 (SACHER, $775 \sim 790 \text{ nm}$, 500 mW)、拉曼光谱仪 (SpectraPro2300i, Acton)、电荷耦合器件 (CCD, Spec-10, Princeton Instruments)、摄影像机系统、干涉陷波滤波器 (HNF)、台式计算机、监视显

示器以及系列透镜组成。 780 nm 的激光束被导入倒置显微镜油浸物镜 [数值孔径 (NA) $1.30, 100\times$], 聚焦后在焦点附近形成了一个单光束光势阱来俘获细胞, 同时这束激光也用于激发被囚禁细胞产生拉曼散射。系统分辨率 6 cm^{-1} , 用 780 nm 激光捕获悬浮于无菌水中的聚苯乙烯小球 (直径 $2 \mu\text{m}$) 记录拉曼光谱并校正系统。

2.4.2 拉曼光谱测定

依次将萌发后孢子与含有不同浓度 ($0, 0.4, 0.8$ 和 1.0 mmol/L) 甲醛的培养基混匀后, 放入拉曼样品池中, 37°C 控温, 在 $0, 0.5, 1.0, 1.5$ 和 2.0 h 时间点随机俘获萌发后孢子, 连续实时测定 30 个孢子的拉曼光谱, 每个孢子测定的积分时间为 30 s , 入射激光功率 17 mW 。

2.5 数据处理

直接将光谱数据以 spe 格式导入软件 Micro-Origin 8.0 进行前处理。应用自编的 Matlab 程序去背景, 进行 7 点平滑, 利用基于多项式拟合的拉曼光谱基线校正软件进行基线校正, 截取 $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 的指纹区作图谱分析, 找出差异明显的谱峰, 分析它们随时间变化的趋势。

3 结果与分析

3.1 萌发后孢子耐受及代谢甲醛能力

图 1(a) 是枯草芽孢杆菌萌发后孢子和杆状营养细胞在 $0 \sim 1.5 \text{ mmol/L}$ 甲醛浓度范围的耐受能力。图中曲线显示两种细胞随着甲醛浓度的增加, 耐受能力不断下降, 营养细胞先是缓慢地下降, 直到浓度为 1.0 mmol/L 时其存活率大约有 30% , 到 1.5 mmol/L 时已经完全不能生长; 经萌发剂 (Ala) 诱导萌发后的孢子在 $0.4 \sim 1.0 \text{ mmol/L}$ 之间有一个平台式的耐受浓度范围, 表明孢子在甲醛胁迫下有一定范围的耐受能力, 但是其耐受甲醛能力远比杆状营养细胞低。

图 1(b) 是萌发后孢子和营养细胞在 0.6 mmol/L 甲醛处理液中对甲醛的吸收曲线。如图所示, 对照组 (CK, 没有浸泡孢子的甲醛溶液) 甲醛浓度在 12 h 内自然蒸发的过程, 甲醛浓度减少远低于处理组; 萌发后孢子与对照组相比, 随着时间的增加其甲醛浓度差异很少, 说明萌发后孢子不能吸收甲醛; 营养细胞在 3 h 时甲醛浓度迅速降低一半, $6 \sim 12 \text{ h}$ 时缓慢降低, 直至稳定, 说明营养细胞具有吸收、代谢溶液里甲醛的能力。

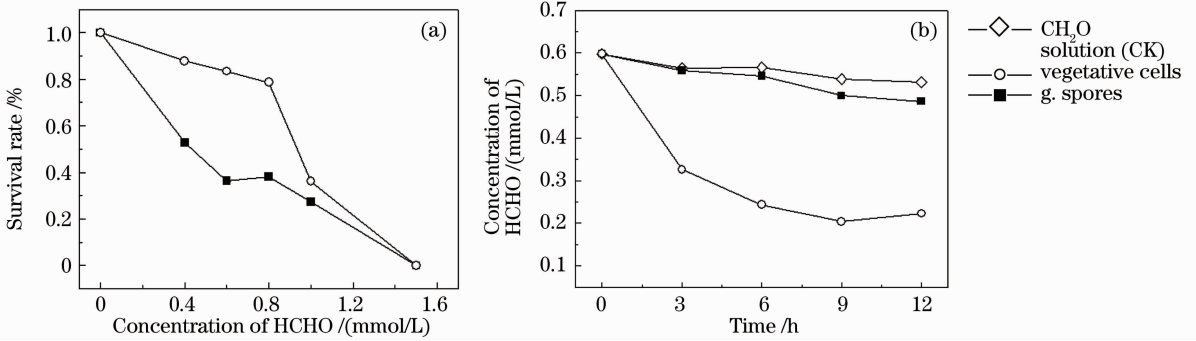


图 1 枯草芽孢杆菌杆状营养细胞和萌发后孢子的耐受甲醛能力(a)及其代谢甲醛能力(b)

Fig.1 Ability of vegetative cells and g. spores of *Bacillus subtilis* (a) tolerating and (b) etabolizing formaldehyde

3.2 甲醛胁迫萌发后孢子生长过程的拉曼光谱

3.2.1 不含甲醛培养基

图 2(a)是萌发后孢子在 2×SG 培养基中生长 2 h,在 0,0.5,1.0,1.5 和 2.0 h 时间点的平均光谱;图 2(b)是选取图 2(a)中的 632,714,770,780,840,990,1083,1241,1323 和 1446 cm⁻¹ 共 10 个特征峰的强度随时间变化的趋势图,各特征峰归属见表 1。如表 1 所示,632,714,1241,1323 和 1446 cm⁻¹ 归属蛋白质的特征峰,其中 632 cm⁻¹ 是蛋白质苯丙

氨酸(Phe)的信号峰,代表蛋白质的酰胺 I,同时也是碳水化合物 N-乙酰基葡萄糖谱峰;714 cm⁻¹ 是蛋白质 C-S 伸缩振动,同时是膜磷脂/腺嘌呤 C-N 伸缩振动峰;1323 cm⁻¹ 是蛋白质 C-H 变形振动,也是多聚核苷酸链振动峰;1446 cm⁻¹ 是碳水化合物、蛋白质和脂质的 CH₃,CH₂ 和 C-OH 弯曲振动。770 cm⁻¹ 和 990 cm⁻¹ 分别归属 D-葡萄糖和碳水化合物。780,840 和 1083 cm⁻¹ 归属核酸^[16,17]。

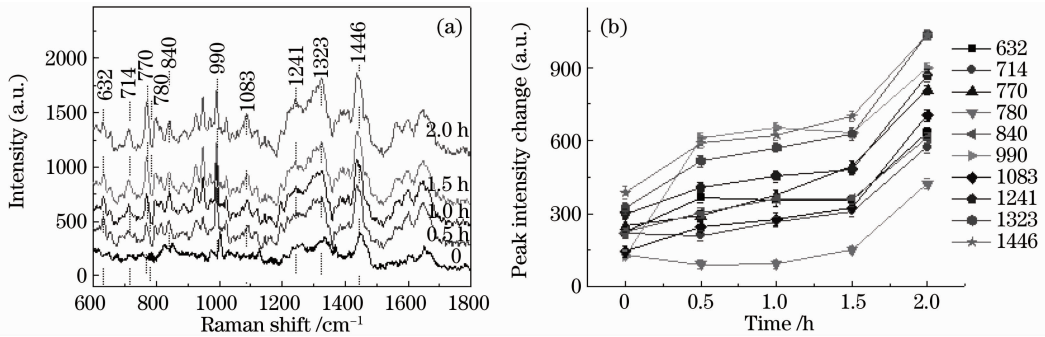


图 2 萌发后孢子在不含甲醛培养基中的拉曼光谱及特征峰强度的变化趋势。(a)萌发后孢子在培养基中 0,0.5,1.0,1.5 和 2.0 h 时间点的拉曼光谱;(b)拉曼特征峰峰强随时间的变化趋势

Fig.2 Raman spectra of g. spores in 0 mmol/L HCHO medium and the trend of band peak intensity changes. (a) Raman spectra of g. spores in medium at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h; (b) trend of band peak intensity changes

表 1 萌发后孢子拉曼光谱特征峰的归属

Table 1 Vibrational assignments for some Raman bands of g. spores

Raman bands /cm ⁻¹	Assignment
632	Phenylalanine (Phe) /N acetyl D glucosamine
714	C-S stretch of proteins; C-N of membrane phospholipid head/adenine
770	D-glucose
780	DNA; O=P-O
840	β-conformation of DNA
990	CH ₂ of carbohydrates
1083	Nucleic acid; stretch of O=P-O
1241	Amide III (random coil)
1323	CH ₂ deformation of protein; polynucleotide chain of DNA-purine bases
1446	CH ₃ , CH ₂ , C-OH bending mode of proteins, carbohydrates and lipids

如图 2(b) 所示, 萌发后孢子在 $2 \times \text{SG}$ 培养基中, 与蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物相关的信号峰峰强随着时间的增加, 首先经历一段缓慢上升过程, 这是萌发后孢子对新环境的一个短暂适应过程, 此间曲线平坦稳定, 显示其内部代谢功能恢复、 α/β 酸溶性蛋白质水解、细胞器逐步完善的过程, 为后续的出芽生长做必要物质准备, 时间大约 1.5 h; 但归属于碳水化合物摇摆振动的 990 cm^{-1} 峰强在 0.5 h 时达到一个比较高的水平, 归属于葡萄糖的 770 cm^{-1} 峰在 $0 \sim 2.0 \text{ h}$ 范围的增加有别于其他峰强变化, 近似线性增加, 表明萌发后孢子为了满足逐步完善细胞器骨架所必须的糖分, 首先摄取培养基中一定数量的糖分转化为细胞的多糖化合物。接着 1.5~2.0 h 阶段是一个快速上升的过程, 是萌发后孢子转到细胞的生长阶段, 代谢活跃, 细胞生长所需的各种酶、辅酶、结构蛋白质、RNA、碳水化合物和脂类等物质在积累, DNA 复制, 细胞体积增大, 为增殖创造物质条件。

3.2.2 0.4 mmol/L 甲醛培养基

图 3(a) 是萌发后孢子在浓度为 0.4 mmol/L 甲醛的培养基中生长 2 h, 在 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的平均光谱; 图 3(b) 是选取与图 2(b) 相同的

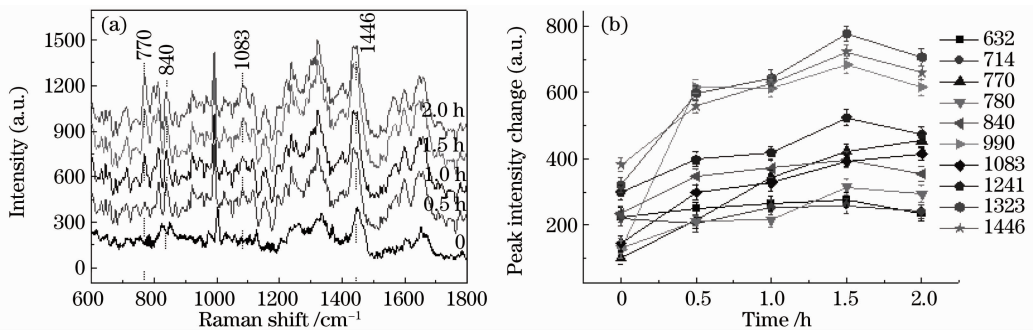


图 3 萌发后孢子在 0.4 mmol/L 甲醛培养基中的拉曼光谱及特征峰强度的变化趋势。(a) 萌发后孢子在 0.4 mmol/L 甲醛培养基中 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的拉曼光谱; (b) 特征峰随时间的变化趋势

Fig. 3 Raman spectra of *G. spores* in 0.4 mmol/L HCHO medium and the trend of band peak intensity changes. (a) Raman spectra of *G. spores* in 0.4 mmol/L HCHO medium at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h; (b) trend of band peak intensity changes

3.2.3 0.8 mmol/L 甲醛培养基

图 4(a) 是萌发后孢子在 0.8 mmol/L 的甲醛的培养基中生长 2 h, 在 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的平均光谱; 图 4(b) 是选取与图 2(b) 相同的 10 个特征峰强随时间变化的趋势图。和 0.4 mmol/L 甲醛培养基中细胞光谱的变化相比, 该浓度甲醛对萌发后孢子的处理造成细胞体内成分下降的临界点提前到了第 1.0 h, 即 $0 \sim 1.0 \text{ h}$ 时间范围内大部分特征峰呈缓慢增加趋势, 1.0 h 以后缓慢下降, 这种变化除了和 0.4 mmol/L 甲醛作用具有类似胁迫效

10 个特征峰强随时间变化的趋势图。在 $0 \sim 1.5 \text{ h}$ 时间范围内, 代表蛋白质、脂类和核酸的特征峰变化特点类似于萌发后孢子在不含甲醛的培养基中的变化趋势, 也是一个缓慢上升过程, 但相对来说, 大部分谱峰峰强增加的幅度更大, 尤其是 1446 和 1323 cm^{-1} 谱峰; 990 cm^{-1} 和 770 cm^{-1} 峰变化趋势在 $0 \sim 1.5 \text{ h}$ 范围则和对照的一致。在 1.5 h 后所有峰强都有一个平缓下降过程, 所以 0.4 mmol/L 的甲醛作用于萌发后孢子体内成分下降的临界点是第 1.5 h。这种变化趋势反映了萌发后孢子在受到甲醛胁迫初期做出较强烈的响应模式, 细胞内的蛋白质和核酸的含量都明显增加, 膜的透性增加。推测是由于细胞受到甲醛胁迫后, 很多基因的表达水平上升, 细胞内代谢水平增加, 碳水化合物、可溶性糖、氨基酸、功能性酶等物质积累也跟着增加, 随着时间推移, 逐步消耗前期积累的物质, 到临界点后, 细胞受到损害, 所以曲线的走势开始下降。图 1(a) 显示萌发后孢子在 0.6 mmol/L 甲醛平板上大约只有 50% 的存活率, 提示曲线在 1.5 h 后的下降趋势有可能还与低浓度甲醛对细胞造成轻度伤害有一定相关性^[18]。

应外, 稍高浓度甲醛胁迫作用下细胞已经受到一定伤害, 代谢作用下降。 714 cm^{-1} 归属于膜磷脂和蛋白质的 C-S 伸缩振动, 在 0.5 h 后即呈明显下降趋势, 推测 0.8 mmol/L 甲醛胁迫细胞后, 甲醛作用于膜脂的碳氢链, 致其断裂; 780 cm^{-1} 归属于核酸的 O=P-O 对称伸缩振动, 结果显示代表 DNA 的拉曼谱峰一开始就慢慢下降, 显示在整个过程中 DNA 不能进行复制。这说明 0.8 mmol/L 的甲醛从开始就对萌发细胞的核酸、蛋白质和脂质产生影响, 但大部分谱峰下降的临界时间点是第 1.0 h。

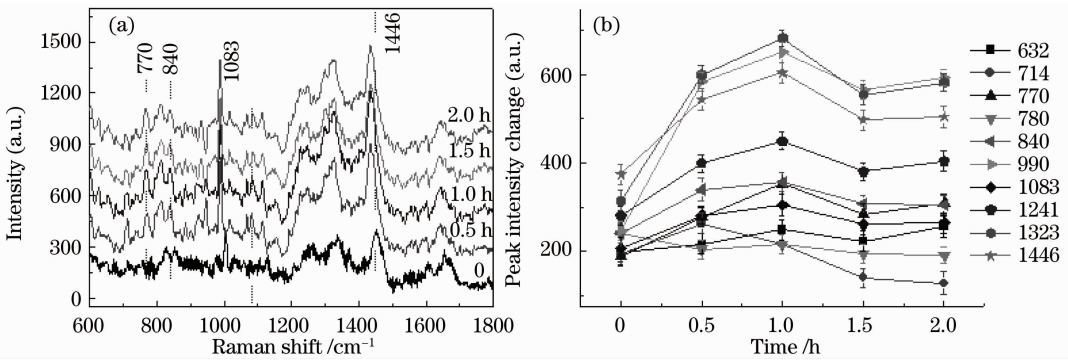


图4 萌发后孢子在 0.8 mmol/L 甲醛培养基中的拉曼光谱及特征峰强度的变化趋势。(a)萌发后孢子在 0.8 mmol/L 甲醛培养基中 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的拉曼光谱;(b)特征峰随时间的变化趋势

Fig. 4 Raman spectra of *g.* spores in 0.8 mmol/L HCHO medium and the trend of band peak intensity changes. (a) Raman spectra of *g.* spores in 0.8 mmol/L HCHO medium at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h; (b) trend of band peak intensity changes

3.2.4 1.0 mmol/L 甲醛培养基

图 5(a)是萌发后孢子在 1.0 mmol/L 的甲醛的培养基中生长 2 h,在 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的平均光谱;图 5(b)是选取与图 2(b)相同的 10 个特征峰强随时间变化的趋势图。和前面几个浓度处理组相比,几乎所有谱峰在 0.5 h 后出现下降趋

势,谱峰下降的临界时间点是第 0.5 h,表明在很短时间内大量外源甲醛被吸收进细胞内作用于细胞的蛋白质、DNA 和脂类等生物大分子,破坏其高级结构,抑制 DNA 的合成,产生了剧烈的胁迫效应,导致蛋白质、核酸、脂类等生物大分子含量严重下降,最终导致细胞受到伤害。

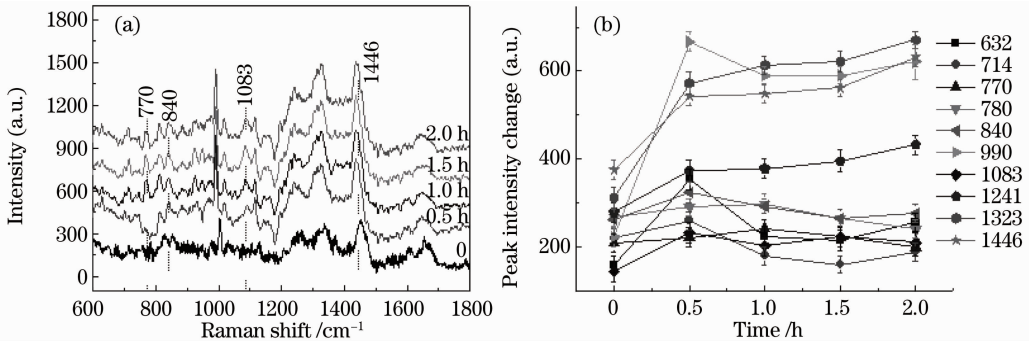


图5 萌发后孢子在 1.0 mmol/L 甲醛培养基中的拉曼光谱及特征峰强度的变化趋势。(a)萌发后孢子在 1.0 mmol/L 甲醛培养基中 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 h 时间点的拉曼光谱;(b)特征峰随时间的变化趋势

Fig. 5 Raman spectra of *g.* spores in 1.0 mmol/L HCHO medium and the trend of band peak intensity changes. (a) Raman spectra of *g.* spores in 1.0 mmol/L HCHO medium at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h; (b) trend of band peak intensity changes

4 结 论

1) 属于非甲基营养菌的枯草芽孢杆菌的萌发后孢子在 0.4~1.0 mmol/L 的甲醛胁迫下有一定范围的耐受能力。但当孢子浸泡在 0.6 mmol/L 的甲醛溶液里时,萌发后孢子不能吸收甲醛,而营养细胞在 0~12 h 内不断吸收溶液中的甲醛,表明营养细胞在甲醛的诱导下,通过 RuMP 途径代谢甲醛进行脱毒。

2) 用 LTRS 系统分析萌发后孢子在不同浓度甲醛胁迫下各种化学成分的变化,结果说明萌发后孢子对不同浓度甲醛产生的生理响应效应是不同

的。在 0.4 mmol/L 的甲醛胁迫下,细胞体内成分下降的时间拐点是第 1.5 h,表明该浓度甲醛对细胞会造成轻度伤害;0.8 mmol/L 的甲醛胁迫细胞,细胞体内成分下降的时间拐点提前到第 1.0 h,在 0.5 h 后表征膜脂碳氢链的峰强下降,在整个过程中也发现 DNA 可能不能进行复制,0.8 mmol/L 的甲醛从开始就对萌发细胞的核酸、蛋白质和脂质产生不利的影响;在 1.0 mmol/L 的甲醛胁迫下,谱峰下降的临界时间点是第 0.5 h,表明细胞对该浓度甲醛产生了剧烈的胁迫响应,导致生物大分子含量严重下降,最终导致细胞受到伤害。

3) 由于用丙氨酸等萌发剂诱导孢子萌发后形成的群体孢子基本处于一致的生长周期, 可以认为它们是同步细胞, 其群体生长大致接近单个细胞的生长状况。所以图 2(b) 也近似地描绘了单个萌发后孢子在培养基中 0~2.0 h 的生长代谢过程。

参 考 文 献

- 1 J. R. Quayle, T. Ferenci. Evolutionary aspects of autotrophy [J]. *Microbiol. Rev.*, 1978, **42**(2): 251~273
- 2 F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer *et al.*. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. *Nature*, 1997, **390**(6657): 249~256
- 3 H. Yasueda, Y. Kawahara, S. Sugimoto. *Bacillus subtilis yckG* and *yckF* encode two key enzymes of the ribulose monophosphate pathway used by methylophilic, and *yckH* is required for their expression [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(23): 7154~7160
- 4 M. Goenrich, R. K. Thauer, H. Yurimoto *et al.*. Formaldehyde activating enzyme (Fae) and hexulose-6-phosphate synthase (Hps) in *Methanosarcina barkeri*: a possible function in ribose-5-phosphate biosynthesis [J]. *Arch. Microbiol.*, 2005, **184**(1): 41~48
- 5 R. Mitsui, Y. Kusano, H. Yurimoto *et al.*. Formaldehyde fixation contributes to detoxification for growth of a nonmethylophilic, *Burkholderia cepacia* TM1, on vanillic acid [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**(10): 6128~6132
- 6 M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks *et al.*. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(19): 5505~5512
- 7 D. Paredes-Sabja, B. Setlow, P. Setlow *et al.*. Characterization of *Clostridium perfringens* spores that lack SpoVA proteins and dipicolinic acid [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, **190**(13): 4648~4659
- 8 H. Yurimoto, R. Hirai, N. Matsuno *et al.*. HxlR, a member of the DUF24 protein family, is a DNA-binding protein that acts as a positive regulator of the formaldehyde-inducible hxlAB operon in *Bacillus subtilis* [J]. *Mol. Microbiol.*, 2005, **57**(2): 511~519
- 9 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Yin Xiaolin *et al.*. Single-cell Raman spectral analysis of oxygenated and deoxygenated thalassemia erythrocytes [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(10): 2854~2859
- 陈秀丽, 王桂文, 尹晓林等. 单细胞拉曼光谱分析地中海贫血红细胞的氧合态和去氧态 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(10): 2854~2859
- 10 Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes in blood [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1043~1048
- 艾敏, 刘军贤, 姚辉璐. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1043~1048
- 11 Zhang Yong, Ye Anpei, Wen Cheng. A micro-Raman spectroscopy combing with optical tweezers [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(2): 491~497
- 张勇, 叶安培, 闻丞. 一种与光镊结合的显微拉曼光谱技术 [J]. *光学学报*, 2010, **30**(2): 491~497
- 12 Wang Guiwen, Peng Lixin, Chen Ping *et al.*. Single-cell Raman spectroscopy of erythrocytes from hemoglobin bart's hydrops [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2651~2656
- 王桂文, 彭立新, 陈萍等. 重型 α 地中海贫血红细胞的拉曼光谱 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2651~2656
- 13 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Tao Zhanhua *et al.*. Raman spectral discrimination of thalassemia erythrocytes based on PCA arithmetic and BP network model [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(9): 2448~2454
- 陈秀丽, 王桂文, 陶站华等. 基于 PCA 和 BP 网络的地中海贫血红细胞拉曼光谱判别 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(9): 2448~2454
- 14 Lin Juqiang, Huang Ruixiang, Li Yongzeng *et al.*. Raman spectroscopy for chick embryo vascular injury with anti-angiogenesis drugs [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2647~2650
- 林居强, 黄瑞香, 李永增等. 抗血管生成药物对鸡胚血管作用的拉曼光谱 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2647~2650
- 15 Huang Shushi, Chen De, L. Pelczar Patricia *et al.*. Levels of Ca^{2+} -dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(13): 4681~4687
- 16 Xu Yiming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 10~141
- 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 10~141
- 17 I. Notingher. Raman spectroscopy cell-based biosensors [J]. *Sensors*, 2007, **7**(8): 1343~1358
- 18 G. McDonnell, A. D. Russell. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, **12**(1): 147~179