

趋磁细菌 WD-1 的超微结构及批量培养方法*

姜 伟** 卫杨保

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘要: 报道了趋磁细菌 WD-1 的超微结构, 菌株 WD-1 的超薄切片清楚地显示了细胞壁 (CW)、细胞膜 (CM)、细胞内部的聚- β -羟基丁酸 (poly- β -hydroxybutyrate) 和磁小体 (Magnetosomes MS)。建立了菌体和磁小体批量培养和收集的方法, 经培养每升培养基可获得 135mg 干菌体。经 SEM 能谱分析菌体和磁小体都含有 Fe、Al、Si、P、S、Ca、Zn 等元素成分; 菌体和磁小体中铁的含量分别为 3.07% 和 84.57%。

关键词: 菌株 WD-1, 超微结构, 批量培养

中图分类号: Q93.129, Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0075-04

ULTRASTRUCTURE AND BATCH CULTURE OF MAGNETOTACTIC BACTERIA STRAIN WD-1

JIANG Wei WEI Yang-Bao

(college of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: The ultrastructure of magnetotactic bacteria strain WD-1 was reported. A thin sectioned profile of it clearly showed its cell wall, cell membrane, poly- β -hydroxybutyrates and magnetosomes. Meanwhile, the method of batch culture of strain WD-1 was also reported, 135mg/L dry cells could be gotten with this method. The energy profiles of X-ray collected after electron excitation in SEM indicated that both dry cells and magnetosomes contained such mineral elements as P, S, Ca, Si, Al and Fe with different content. The iron content of its cells and magnetosomes was 3.07% and 84.57% respectively.

Key words: Strain WD-1, Ultrastructure, Batch culture

* 国家自然科学基金资助项目

Project Granted by chinese National Natural Science Fund.

** 现在中国农业大学攻读博士学位

收稿日期: 2000-03-23, 修回日期: 2000-06-4

趋磁细菌是 Blakemore^[1]于1975年发现的对磁场具有趋性的一类细菌,经研究证明其内部含有对磁场敏感的磁小体(Magnetosomes)。由于这种磁小体可被用于作为酶载体^[2],抗体载体,用这种细菌制备磁性细胞^[3,4],用于进行基因转移^[5]等,因而引起了部分学者的关注。我们在武昌东湖水域中分离得到了趋磁细菌菌株WD-1^[6],并对其生理生化特性及磁小体的合成条件进行了研究^[7]。现将该菌株的超微结构及菌体和磁小体的批量培养方法报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 趋磁细菌菌株:WD-1。

1.1.2 培养基:蒸馏水 98mL,矿质元素混合液 1mL,维生素混合液 1mL,磷酸二氢钾 68mg,磷酸氢二钾 114mg,柠檬酸 100mg,硫酸铵 20mg,奎尼酸铁 $25\mu\text{mol/L}$,巯基乙醇酸钠 50mg, $V_{B12}5\mu\text{g}$,刃天青 0.2mg。

1.2 方法

1.2.1 超薄切片按如下方法进行:菌体培养物→离心(8000r/min, 5min)→2%锇酸水溶液固定2h→0.2mol/L二甲胂酸钠缓冲液洗3次→1%的agar预包埋→丙酮脱水(50%→85%→95%→100%)→Epon812树脂包埋→LKB-V型切片片机切片(速度5min/s,厚度约500Å)→醋酸铀染色30min→柠檬酸铅染色30min→JEM型TEM80KV观察。

1.2.2 批量培养方法:用如图1所示装置,在10L血清瓶中装入9.5L培养基至起始位置,8层纱布封口,连同装置附件一起 $0.55 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌30min。冷却后无菌操作打开纱布,加无菌培养至起始位置(补充灭菌蒸发部分),塞上橡皮塞等附件,取下玻管螺帽,接上橡皮管(另一端连接有装满无菌棉花的玻璃管),同时打开夹子,充入 N_2 至培养基流出至终止位置(约剩下6L培养基),使瓶内 $O_2\% = 2\% \sim 3\%$,迅速取下橡皮管终止充 N_2 ,夹紧夹子,接入5%的种子,盖上螺帽,28℃培养7~9d。

1.2.3 菌体及磁小体收集方法:见流程图(图2)。

1.2.4 菌体及磁小体 SEM 能谱分析:将上述方法所得的丙酮干粉和磁小体置于扫描电镜下进行能谱分析。

2 结果与讨论

2.1 批量培养

按上述批量培养方法,10L血清瓶中装入培养基6L,接种量5%,培养7~9d后,瓶内菌体浓度 $OD_{600nm} = 0.06$,离心收集可得135mg/L干菌体。

2.2 超微结构

见图3。趋磁细菌WD-1的超薄切片清晰的显示了细胞壁及细胞膜,细胞内含有电

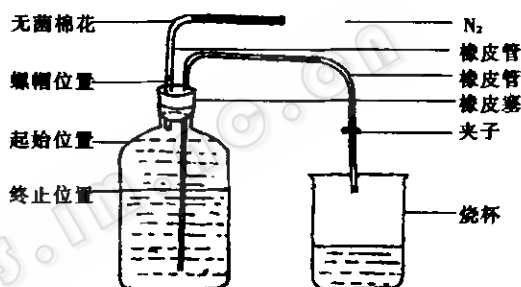


图1 菌株WD-1批量培养装置示意图

子致密的磁小体, 大小为 $375\text{\AA} \sim 500\text{\AA}$, 链状排列的磁小体之间的距离为 $400\text{\AA} \sim 500\text{\AA}$, 另外细胞内还含有电子透过的聚- β -羟基丁酸颗粒 (PHB), 大小为 $0.03\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m}$ 。

文献报道磁小体外面有一层生物膜包被, 使磁小体间彼此隔开^[8], 但从菌株 WD-1 的超薄切片图上无法看清这一层膜, 这可能与 TEM 的分辨力有关。我们所使用的 TEM 观察电压为 80kV , 而文献使用的是 200kV , 磁小体的大小和排列方式都与文献相符。但 WD-1 体内的磁小体数量较少, 且出现链状排列的几率较小, 这可能与 WD-1 本身的遗传特性和外界条件有关。

2.3 菌体及磁小体 SEM 能谱分析

见图 4、图 5 及表 1。结果表明菌体主要由 Al、Si、Ca、P、S、Fe、Zn 等元素组成, 其中 Fe 含量为 3.07%; 磁小体主要由 Al、Si、Ca、P、S、Fe 等元素组成, 其中 Fe 含量为 84.57%, 与 TEM 能谱分析结果吻合^[6]。从磁小体的元素含量看, S 元素的含量为 0.93%, 排除了菌株 WD-1 体内的磁小体为铁的硫化物的可能性。从现有文献看磁小体的主要成分为 Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 FeS 等, 因而推断其可能是铁的氧化物 (能谱分析无法分析氧元素), 进一步确证需做穆斯保尔谱线研究。

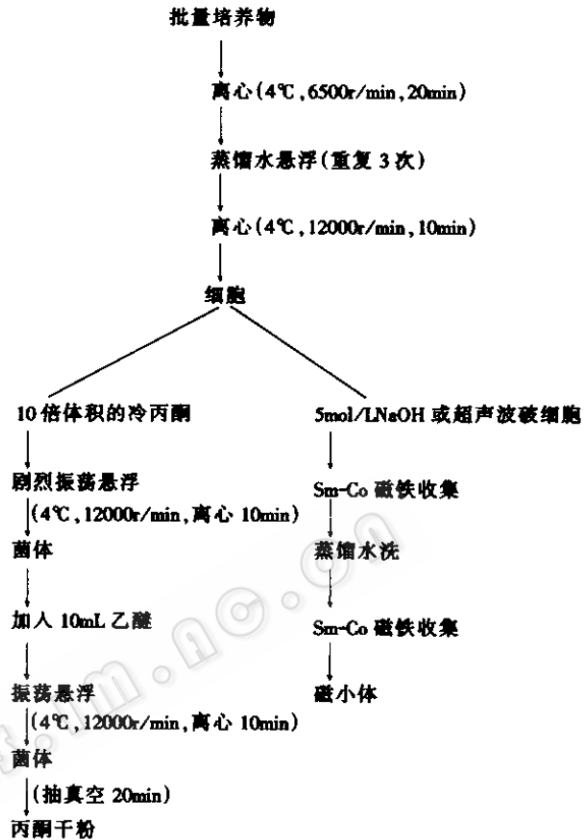


图 2 菌体和磁小体收集流程图

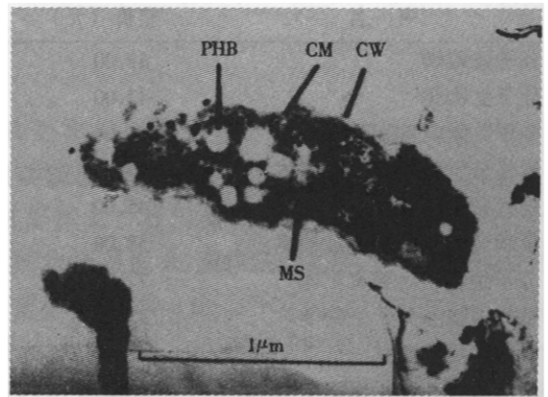


图 3 趋磁细菌 WD-1 的超薄切片图

表 1 趋磁细菌 WD-1 菌体细胞和磁小体 SEM 能谱分析元素成分表

	Al	Si	P	S	K	Fe	Ca	Zn
菌体细胞 (wt%)	6.59	16.16	38.02	27.33	8.82	3.07	-	-
磁小体 (wt%)	3.89	4.33	1.22	0.93	-	84.57	2.21	2.75

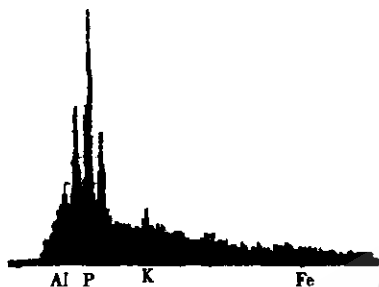


图4 菌株WD-1菌体SEM能谱分析图

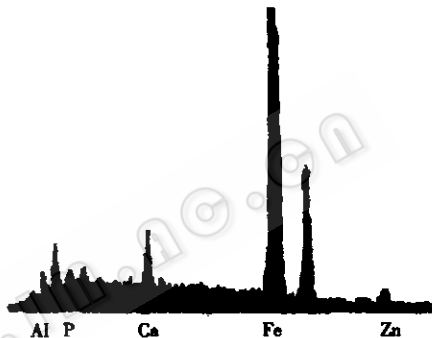


图5 菌株WD-1磁小体SEM能谱分析图

参考文献

- [1] Blakemore R P. *Science*, 1975, 190: 377 ~ 379.
- [2] Matsumaga T, Kamiya S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26: 328 ~ 332.
- [3] Yen S P S, Rembaum A. *Nature*, 1977, 268 (4): 437 ~ 438.
- [4] Matsumaga T, Hashimoto K, Nakamura N, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 401 ~ 405.
- [5] Matsumaga T. *TIBTECH-MARCH*, 1991, 9: 91 ~ 95.
- [6] 卫杨保, 张洪霞, 姜伟, 等. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1994, 6: 115 ~ 120.
- [7] 卫杨保, 姜伟, 张洪霞, 等. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1994, 6: 121 ~ 127.
- [8] Balkwill D L, Maratea D, Blakemore R P. *J Bacterial*, 1980, 141 (3): 1399 ~ 1480.