



木葡糖酸醋杆菌趋化性的初步研究

李晶, 贾士儒, 杨洪江, 闫林, 朱会霞

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 采用毛细管法研究了木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinum*)的趋化性反应,结果显示 pH、趋化时间、温度、氨基酸、碳源、酸和重金属离子对木葡糖酸醋杆菌趋化性反应有影响.木葡糖酸醋杆菌在温度 25~30℃, pH 为 5 时趋化性反应最高;最佳趋化时间为 60 min;在 7 种氨基酸中 L-亮氨酸、L-丙氨酸、L-甘氨酸、L-甲硫氨酸对木葡糖酸醋杆菌的趋化性反应有促进作用;6 种碳源中,葡萄糖对趋化性有促进作用,蔗糖、乳糖、麦芽糖、半乳糖、甘油对趋化性反应有抑制作用;4 种酸中柠檬酸对趋化性反应有显著的抑制作用;Sn²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Cr²⁺、Co²⁺离子都对趋化性反应有抑制作用.

关键词: 木葡糖酸醋杆菌;趋化性;毛细管法

中图分类号: Q935

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2012)01-0001-04

Preliminary Study of Chemotaxis of *Gluconacetobacter xylinum*

LI Jing, JIA Shiru, YANG Hongjiang, YAN Lin, ZHU Huixia

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Capillary assay was used in this research to investigate the chemotaxis of *G. xylinum*. The results showed that pH, chemotactic time, temperature, amino acids, carbon resources, acids and metal all ions had influence on chemotaxis of *G. xylinum* and the optimal chemotaxis of *G. xylinum* happened when pH was 5, temperature was 25~30℃ and the duration was 60 minutes. Among 7 kinds of amino acids tested, L-leucine, L-alanine, L-glycine, L-methionine promoted the chemotaxis of *G. xylinum*. Among 6 kinds of carbohydrates, glucose promoted the chemotaxis of *G. xylinum* remarkably, whereas sucrose, lactose, maltose, galactose and glycerol inhibited chemotactic response. Among 4 kinds of acids, citric acid inhibited chemotactic response of *G. xylinum* significantly. So did Sn²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Cr²⁺, Co²⁺.

Key words: *Gluconacetobacter xylinum*; chemotaxis; capillary assay

木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinum*)是研究最早最透彻的生产细菌纤维素的菌株^[1],其生产的细菌纤维素可广泛应用于食品、造纸、医学等诸多领域^[2-4].细菌的趋化性是有运动能力的细菌对化学浓度梯度作出的反应,使细菌趋向有益物质,逃避有害刺激^[5].细菌的趋化性对微生物种群动力性有重要作用,表现在当细菌出现趋化物浓度梯度时有明显的生长优势,因此细菌的趋化性在病原菌的致病机制、生物膜的形成等领域有重要意义^[6].研究细菌趋化性有很多方法,除近年来开发的线性浓度梯度微通道装置可对趋化性反应进行较为精确的定量分析^[7]外,常

用的方法还有游动平板法和毛细管法^[5].目前对趋化性研究较透彻的是大肠杆菌,对木葡糖酸醋杆菌趋化性的研究报道甚微.为此,本文采用毛细管法研究不同培养参数对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus* CGMCC No.1.1812),工业发酵微生物教育部重点实

收稿日期: 2011-09-25; 修回日期: 2011-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20976133)

作者简介: 李晶(1988—),女,内蒙古呼伦贝尔人,硕士研究生;通信作者: 贾士儒,教授, jiashiru@tust.edu.cn.

实验室保藏.

1.1.2 培养基

液体培养基(g/L): 葡萄糖 25, 酵母粉 7.5, 蛋白胨 10, Na_2HPO_4 10, pH 6.0.

固体培养基(g/L): 葡萄糖 25, 酵母粉 7.5, 蛋白胨 10, Na_2HPO_4 10, 琼脂 20.

无机培养基(g/L): Na_2HPO_4 3, KH_2PO_4 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, MgCl_2 0.02, CaCl_2 0.02, 对氨基苯甲酸 0.001 5, pH 6.0.

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备

取甘油管中保存的菌液接入装有 100 mL 液体培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 加入 1 mL 纤维素酶(10 000 U/mL) 酶解后 5 000 r/min 离心 10 min 得到沉淀的菌体, 用趋化缓冲液(0.01 mol/L 磷酸氢钾盐缓冲液含 0.1 mol/L EDTA)洗 3 次, 调至 A_{600} 为 0.1 左右.

1.2.2 趋化待测液的制备

配制 0.1 g/L 葡萄糖溶液, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 最后加到无机培养基的终浓度为 1 mmol/L. 其他碳源、氨基酸、酸和金属离子趋化待测液的配制同葡萄糖趋化待测液, 终浓度皆为 1 mmol/L.

1.2.3 趋化性反应实验

采用改进的毛细管法进行趋化性反应实验^[8-9]. 玻璃毛细管(内径为 0.3 mm)一端吸入趋化待测液, 另一端蜡融封闭, 将毛细管插入到含 300 μL 菌液的 1 mL 注射器中. 30 °C 下水水平孵育 60 min. 用灭菌水冲毛细管外壁以去除附着的菌液, 折断毛细管后将内含物吹入 EP 管中, 加入 1 mL 无菌水稀释 100 倍后取 100 μL 菌液涂布固体平板. 平板于 30 °C 下培养 4 d, 统计单菌落个数. 以毛细管中细菌数来衡量木葡糖酸醋杆菌趋化性反应的大小.

1.2.4 pH 对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

配制不同 pH 趋化缓冲液, 加入终浓度为 1 mmol/L 葡萄糖趋化待测液, 按 1.2.3 的方法进行趋化实验.

1.2.5 温度对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

在不同温度下按 1.2.3 的方法进行趋化实验.

1.2.6 趋化时间对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

按 1.2.3 的方法测定不同趋化时间的菌体趋化结果.

1.2.7 数据分析

实验数据采用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 软件进行分析.

2 结果与讨论

2.1 pH 对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

pH 对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图 1 所示. 当 pH 为 5 时木葡糖酸醋杆菌在毛细管中的细菌数高于其他实验组($P < 0.05$). Hwang 等^[10]研究发现木葡糖酸醋杆菌在 pH 5.5 最适合细菌增长和细菌纤维素合成. 马霞^[11]的实验结论证明, 木葡糖酸醋杆菌生长的最适 pH 范围为 4.0 ~ 6.0. 这表明不同 pH 对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响与对生长的影响一致.

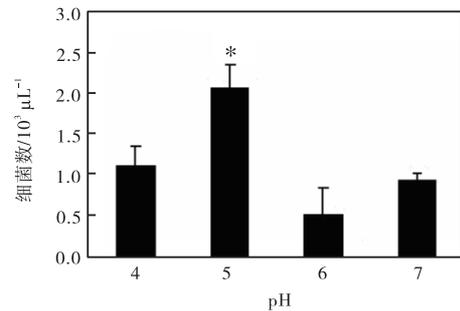


图 1 pH 对毛细管中细菌数的影响

Fig.1 Influence of pH on bacterial number in capillary

2.2 温度对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

温度对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图 2 所示. 在温度为 25 °C 时毛细管中细菌数显著高于 15 °C 和 20 °C 实验组($P < 0.05$), 与 30 °C 实验组相比无显著性差异. Adler^[5]研究发现大肠杆菌在 15 °C 或以下无趋化性, 说明温度对细菌趋化性有影响. Larsen 等^[12]认为温度对趋化的影响可能与信号转导蛋白和受体的磷酸化和甲基化相关, 它们都随温度升高而增强, 因为磷酸化和甲基化过程需要有酶参与, 而酶的活性与温度有关. 木葡糖酸醋杆菌的最适生长温度为 30 °C, 结果表明趋化最适温度与其生长的最适温度有一定偶联关系.

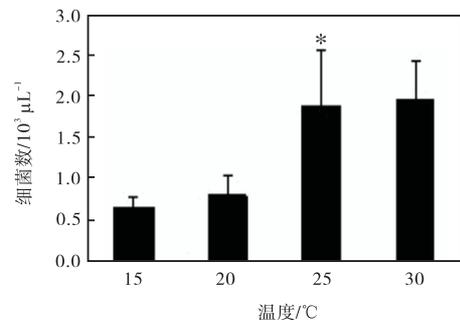


图 2 温度对毛细管中细菌数的影响

Fig.2 Influence of temperature on bacterial number in capillary

2.3 趋化时间对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

趋化时间对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图3所示. 随着时间的延长,毛细管中细菌数不断增加,在60 min时显著高于30 min和45 min实验组($P < 0.05$),与75 min实验组无显著性差异,显示当时间继续延长不会提高趋化性反应. Berg等^[13]在大肠杆菌毛细管趋化性实验中也选择60 min为趋化时间. 趋化时间再延长而趋化细菌数并不增加,可能因为细菌的趋化运动在60 min达到饱和,还可能因为木葡糖酸醋杆菌产生的纤维素丝相互交织从而阻碍了菌体的运动.

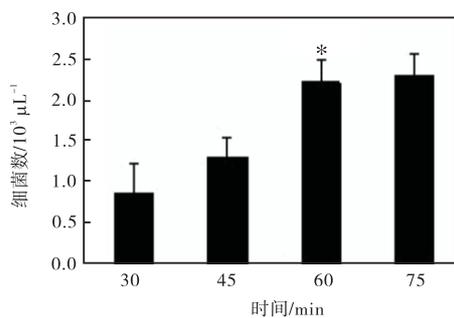


图3 趋化时间对毛细管中细菌数的影响

Fig.3 Influence of incubation time on bacterial number in capillary

2.4 氨基酸对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

氨基酸对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图4所示. L-亮氨酸(Leu)、L-丙氨酸(Ala)、L-甘氨酸(Gly)、L-甲硫氨酸(Met)实验组毛细管中细菌数显著多于对照组($P < 0.05$). L-天门冬氨酸(Asp)、L-色氨酸(Thr)、L-苏氨酸(Trp),实验组与对照组无显著性差异. 氨基酸作为有机氮源可促进木葡糖酸醋杆菌的生长. Matsuoka等^[14]研究发现,甲硫氨酸可以显著促进木葡糖酸醋杆菌生长,而本文的研究中发现,L-甲硫氨酸对趋化的促进作用也最大.

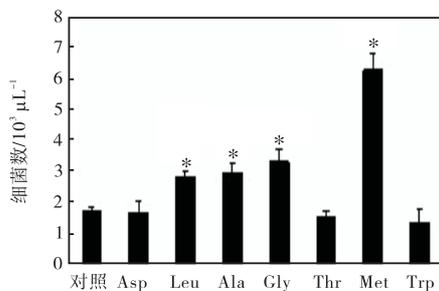


图4 氨基酸对毛细管中细菌数的影响

Fig.4 Influence of amino acids on bacterial number in capillary

2.5 酸对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

酸对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图5所示. 柠檬酸实验组毛细管中细菌数显著低于对照组($P < 0.05$). 马霞等^[15]研究发现乙酸和柠檬酸均对木葡糖酸醋杆菌的生长有促进作用,因有机酸可参与到代谢途径为菌体提供能量. Alexandre等^[16]研究了巴西固氮螺菌的趋化性,发现代谢物如苹果酸等有增强巴西固氮螺菌趋化性的作用,这种代谢物增强细菌趋化性的反应称为能量依赖型趋化性反应. 柠檬酸和乙酸是木葡糖酸醋杆菌的代谢物,实验中发现这两种代谢物未增强木葡糖酸醋杆菌的趋化性反应,因此木葡糖酸醋杆菌的趋化性反应类型可能属于非能量依赖型趋化性反应.

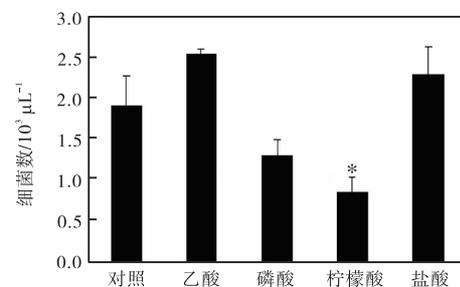


图5 酸对毛细管中细菌数的影响

Fig.5 Influence of acids on bacterial number in capillary

2.6 碳源对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

图6所示碳源对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响. 葡萄糖实验组毛细管中细菌数显著多于对照组,其余各组显著低于实验组($P < 0.05$). Gaworzewska等^[17]研究葡萄糖和蔗糖对豆科根瘤菌趋化性的影响分别是促进作用和抑制作用,这与对木葡糖酸醋杆菌的趋化作用影响相同. 而对碳源影响趋化性可能由于其参与代谢,会对趋化信号分子的传导产生影响^[8].

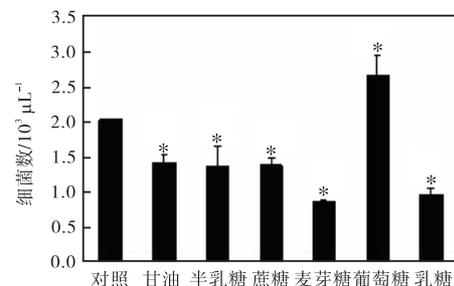


图6 碳源对毛细管中细菌数的影响

Fig.6 Influence of carbon resources on bacterial number in capillary

2.7 金属离子对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响

金属离子对木葡糖酸醋杆菌趋化性的影响如图

7 所示, Sn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Co^{2+} 离子实验组毛细管中细菌数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。细菌的趋化性不仅可以使细菌趋向有益物质, 获得更多的碳源、能源等, 还可以使其逃避有害物质, 如重金属离子的毒害作用。Tso 等^[18]证明大肠杆菌可以对许多化合物产生负趋化, 其中包括金属离子。木葡糖酸醋杆菌受体蛋白的种类和作用还需要进一步研究。

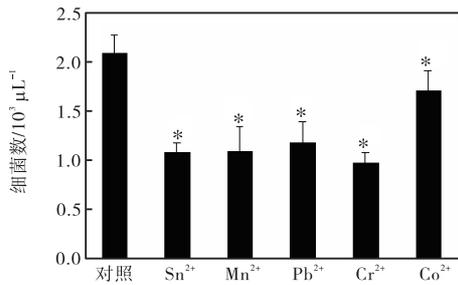


图7 金属离子对毛细管中细菌数的影响

Fig.7 Influence of metal ion on bacterial number in capillary

3 结论

木葡糖酸醋杆菌在温度 25 ~ 30 °C、pH 5、趋化时间 60 min 时趋化性反应最高; *L*-亮氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-甘氨酸、*L*-甲硫氨酸、葡萄糖对木葡糖酸醋杆菌的趋化性反应有促进作用; 柠檬酸、蔗糖、乳糖、麦芽糖、半乳糖、甘油、 Sn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Co^{2+} 对趋化性反应有显著的抑制作用。而木葡糖酸醋杆菌趋化信号的传导、趋化性产生的机理和趋化性相关基因等需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Peter R, Raphael M, Moshe B. Cellulose biosynthesis and function in bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(1): 35-58.
- [2] 贾士儒, 欧宏宇, 傅强. 新型生物材料: 细菌纤维素[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(1): 54-58.
- [3] Zhu Huixia, Jia Shiru, Wan Tong, et al. Biosynthesis of spherical Fe_3O_4 /bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1558-1564.
- [4] 汤卫华. 细菌纤维素的生物合成、性质分析及其应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- [5] Adler J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*[J]. Journal of General Microbiology, 1973, 74(1): 77-91.
- [6] Freter R, O'Brien P C, Macsai M S. Effect of chemotaxis on the interaction of choiera vibrios with intestinal mucosa[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1979, 32: 128-132.
- [7] Jeon H, Lee Y, Jin S, et al. Quantitative analysis of single bacterial chemotaxis using a linear concentration gradient microchannel[J]. Biomed Microdevices, 2009(11): 1135-1143.
- [8] 邹文政, 纪荣兴, 义家波, 等. 河流弧菌对牙鲆表皮粘液的趋化作用[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 318-325.
- [9] Toole R O, Lundberg S, Fredriksson S A, et al. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(4): 4308-4317.
- [10] Hwang J W, Yang Y K, Hwang J K, et al. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(2): 183-188.
- [11] 马霞. 发酵生产细菌纤维素及其作为医学材料的应用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.
- [12] Larsen M H, Blackburn M, Larsen J L, et al. Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*[J]. Microbiology, 2004, 150(5): 1283-1290.
- [13] Berg H C, Brown D A. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking[J]. Nature, 1972, 239(5374): 500-504.
- [14] Matsuoka M, Tsuchida T, Matsushita K. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. sucrofermentans[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60(4): 575-579.
- [15] 马霞, 贾士儒, 关凤梅, 等. 有机酸对木醋杆菌合成细菌纤维素的影响规律[J]. 纤维素科学与技术, 2003, 11(1): 35-37.
- [16] Alexandre G, Greer S E, Zhulin I B. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(21): 6042-6048.
- [17] Gaworzewska E T, Carlile M J. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(6): 1179-1188.
- [18] Tso W W, Adler J. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 118(2): 560-576.

责任编辑: 郎婧