

生物磁性纳米材料——磁小体培养优化 及形成过程研究*

张宇红^{1,2} 武洪庆^{1,3} 肖天¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 辽宁省环境科学研究院辽宁省流域污染控制重点实验室 沈阳 110031; 3. 河北工业大学化工学院 天津 300130)

提要 采用正交试验的方法优化磁小体培养条件, 结果使趋磁细菌 OD_{600} 达到 0.440 (生物量为 1.166×10^9 cells/ml), 同时运用磁收集传代法, 使趋磁细菌 C_{mag} 值稳定在 1.9—2.0。培养时用透射电镜观察磁小体形成过程, 结果发现培养 24h 细菌体内已有较小晶体形成且沿长轴分布; 48h 晶体长大且形成分段链沿长轴排列; 72h 晶体进一步成熟仍以分段链沿长轴排列; 随后细菌逐渐衰亡磁小体变小, 168h 可见部分自溶细菌中仍有磁小体链; 192h 细菌自溶磁小体链分散到环境中。还观察到磁小体在细菌分裂时采用两种分离方式, 一种为磁小体分配到两个子细胞; 另一种为磁小体只分配到一个子细胞。无磁小体的子细胞, 一部分逐渐产生磁小体, 另一部分不产生磁小体。

关键词 趋磁细菌, 磁小体, 优化培养, 功能材料

中图分类号 Q93

磁小体 (Magnetosome) 存在于趋磁细菌 (magnetotactic bacteria) 中, 是一种天然的生物磁性纳米材料, 使得趋磁细菌能够沿磁力线运动 (OATZ) (Bazylinski *et al*, 1995; Bazylinski, 1999)。自然界中的趋磁细菌广泛分布于世界各地 (Flies *et al*, 2005), 火星的陨石中也认为可能有趋磁细菌的化石 (Weiss *et al*, 2004; Thomas-Keprta *et al*, 2000, 2001, 2002; Friedmann *et al*, 2001)。自从 1975 年被美国科学家 Blakemore 发现以来, 受到了科学家们的广泛关注 (Blakemore, 1975)。然而, 由于趋磁细菌在环境中需要微好氧条件 (范国昌等, 1998), 且营养类型属于化能自养 (贾蓉芬等, 2001), 使得目前能够纯培养的菌株数目很少, 虽然很多存在于自然环境中的趋磁细菌在显微镜下被观察到 (Bazylinski *et al*, 2000), 但是在实验室中难以分离纯化, 只有少数菌株得到纯培养 (Schüler *et al*, 1999; Lins *et al*, 2003; 高峻等, 2004; Matsunaga *et al*, 1991, 1996), 致使对趋磁细菌的研究

常受到试验材料限制。

有报道认为磁小体类似于趋磁细菌的细胞器, 而原核生物被认为没有细胞器 (Bazylinski *et al*, 2004; Grünberg *et al*, 2001)。如果磁小体是原核细胞的细胞器, 那么磁小体伴随着趋磁细菌细胞生长和分离时的变化成为备受关注的问题。Scheffel 等 (2006) 曾对趋磁细菌 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (MSR-1) 菌株磁小体链的形成进行研究, 并提出假设: 趋磁细菌的生物矿化最初起始于多个不连续的位点, 这些位点沿细胞长轴分布。随着磁性晶体的不断长大, 它们的磁力运动逐渐加强, 使得这些晶体相互作用。然后, 位于细胞中部的磁小体沿着纤丝逐渐集中。当这些晶体紧密地接触时形成磁小体链。逐渐成熟的磁小体链由于磁小体膜的相互作用进一步趋于稳定 (Scheffel *et al*, 2006)。而其它趋磁细菌菌株磁小体链的形成是否经历了同样的过程尚未见报道。趋磁细菌 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 菌株与 MSR-1 菌

* 人类前沿科学研究计划, HFSP RGP0035/2004-C 号; 中国科学院海外杰出学者基金, 2006-1-15 号; 国家自然科学基金项目资助, 40776094 号。张宇红, 博士, E-mail: zhangyhhit@163.com

通讯作者: 肖天, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: txiao@qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-08-25, 收修改稿日期: 2008-12-23

株同属于 α -变形菌纲(α -proteobacteria)的磁螺菌属(*Magnetospirillum*), 但二者在形态、生理生化等方面又有区别(孙建波等, 2007)。如果以 AMB-1 为试验对象来研究磁小体形成过程, 找出磁小体生长规律, 或许可以证实趋磁细菌磁小体的形成方式并不是某株趋磁细菌特定存在的, 对于推测不同趋磁细菌磁小体形成规律具有意义, 对于研究原核细胞的细胞器也具有意义。然而, 对于 AMB-1 的研究仍存在问题, 如发酵罐条件下细菌细胞数量可达 1.51×10^9 cells/ml, 但具有磁小体细胞比例仅为 53% (Yang *et al.*, 2001); 培养瓶条件下具有磁小体细胞比例可达 100% (Schüler *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2007), 但细菌细胞数量却是 4.24×10^8 cells/ml (王小柯等, 2007)。本研究首先在培养瓶中对趋磁细菌的培养条件进行优化, 提高 AMB-1 的生物量, 且提高具有磁小体细胞的比例, 使 AMB-1 生长处于较佳条件下研究磁小体形成过程及变化特点。

1 材料与方法

1.1 受试菌株

趋磁细菌 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 最早由日本学者从水体中分离(Matsunaga *et al.*, 1991)。本研究所用菌株购于美国标准菌种收藏所(American Type Culture Collection, ATCC), 菌种编号 ATCC700264。

1.2 优化的培养基

蒸馏水 1.0L, Wolfe's 无机盐混合液 5.0ml, Wolfe's 维生素混合液 10.0ml, 奎尼酸铁 0.02mmol, 0.1% 刃天青 0.45ml, 磷酸二氢钾 0.68g, 硝酸钠 0.12g, 琥珀酸 0.74g, L-半胱氨酸 0.05g, 蛋白胨 0.2g, 酵母提取物 0.1g。Wolfe's 无机盐混合液与 Wolfe's 维生素混合液配方见文献(Blakemore *et al.*, 1979)。用氢氧化钠调 pH 值至 6.7。

pH 计: JENCO 6173。

1.3 AMB-1 OD_{600} 的测定

测量 OD_{600} 时将分光光度计波长调至 600nm, 以蒸馏水调零, 取待测菌液 3ml 放入分光光度计的比色杯中进行测定。

分光光度计: UNIC WFJ 7200。

1.4 AMB-1 生长量的测定

测量 OD_{600} 的同时取 AMB-1 菌液 50 μ l(在超净工作台中进行), 滴于经过苏丹黑染色的滤膜上, 0.1% 吖啶橙染色 1min, 置于荧光显微镜下观察计数, 每个样品计数 10 个视野计算平均值, 乘以荧光显微镜

系数 17422, 然后计算出单位体积内的细菌细胞数。

超净工作台: AIR TECH SW-CJ-1BU; 苏丹黑乙醇溶液: 0.1g 苏丹黑溶于 20ml 95%乙醇中; 滤膜: 直径 25mm, 孔径 0.22 μ m; 荧光显微镜: OLYMPUS BH-2。

1.5 AMB-1 Cmag 值的测定

测量 OD_{600} 的同时进行 Cmag 值的测定。在分光光度计中待测菌液周围分别外加水平磁场和垂直磁场, 于波长 600nm 测定 OD 值。水平磁场下的 OD_{600} 值除以垂直磁场下的 OD_{600} 值所得结果为 Cmag 值, 即 $Cmag = OD_{\text{水平}} / OD_{\text{垂直}}$ (Schüler *et al.*, 1995)。

测量 Cmag 值装置: 中国科学院电工研究所生物医学工程研究部电磁生物工程研究组提供。分光光度计: 同 1.3。

1.6 培养条件的优化

1.6.1 正交试验优化 AMB-1 培养条件 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 优化 AMB-1 培养条件, 以 AMB-1 OD_{600} 作为考察指标。试验因素分别选择铁源、装瓶量(125ml 螺口瓶)、pH 值和温度(表 1)。

表 1 正交试验因素水平表
Tab.1 Factors and levels in the orthogonal experiments

水平	A	B	C	D
	铁源 (0.02mmol/L)	装瓶量(%)	pH 值	温度()
1	硫酸亚铁	95	6.5	20
2	柠檬酸铁	75	6.7	25
3	奎尼酸铁	50	6.9	30

1.6.2 SPSS 软件分析正交试验结果 正交试验中, 每组试验进行三次重复试验, 所得结果利用 SPSS 软件进行直观分析和方差分析, 找出培养条件中对 AMB-1 生长影响最大的因素以及最利于 AMB-1 生长的培养条件。

1.7 AMB-1 Cmag 值的提高

细菌在每次传代前, 用透明胶带粘贴磁铁(0.37 特斯拉)于种子液培养瓶外壁, 静置一段时间, 带有磁小体的细菌在培养瓶中聚集于对应贴有磁铁的内壁, 形成磁斑。传代时, 用移液枪吸取磁斑注入新鲜培养基中, 将所得菌液放入培养箱中培养。AMB-1 Cmag 值的提高要经过 10 次磁收集传代法转接并培养。

1.8 磁小体在 AMB-1 中变化过程的试验

分别取 1ml 不同培养时间(24、48、72、96、120、144、168 和 192h)的 AMB-1 菌液于转速 10000r/min

离心 2min, 去上清, 沉淀物用超纯水洗涤并离心, 重复 3 次后沉淀物稀释至 200 μ l。分别取上述稀释后的菌液各 10 μ l 滴铜网。将铜网置于干燥器中干燥。透射电镜观察不同时间细菌的形态、磁小体形成以及磁小体链的变化情况。

透射电镜: HITACHI H-7000, 加速电压: 25—125kV, 放大倍数: 1000—600000 倍, 分辨率: 晶格分辨 2.04 \AA 。

1.9 不同培养时间磁小体测量与大小分布

使用 1.8 中所述透射电镜的照相系统对观察到的磁小体进行拍照, 将所得照片用扫描仪在分辨率 2400dpi 下进行扫描, 得到磁小体的数码照片。测量时将磁小体看成处于同一个平面的椭圆形, 分别测量椭圆形的长轴(L)和短轴(W), 磁小体大小为 L 和 W 的平均值。由于 AMB-1 的磁小体为立方八面体, 且形态影响因子(Shape factor)接近于 1 (0.75—1 占 85%), 近似于球形。故可以用 L 和 W 的平均值表示磁小体大小。虽然这种方法与实际测量磁小体大小还是有区别, 但这种区别对于研究磁小体大小分布来说可以忽略不计(Devouard *et al*, 1998)。为了减小误差, 测量时用 Adobe Photoshop CS 8.0 软件将扫描得到的数码文件放大 8 倍进行测量, 所得结果乘以 1/8。

研究磁小体大小分布时, 采用上述测量数据对 8 组(每组 3 个平行样)不同培养时间(24、48、72、96、120、144、168 和 192h)的磁小体进行统计。每组统计 10 个细菌细胞, 每组统计磁小体不少于 150 个。

扫描仪: BenQ SCANNER 7550T。

1.10 趋磁细菌分裂的透射电镜观察

透射电镜下观察分裂的趋磁细菌, 方法见参考文献(Fbrahim-Nesbat *et al*, 1990)。

2 结果

2.1 正交试验优化 AMB-1 生物量及结果分析

通过正交试验设计 $L_9(3^4)$, 选用对 AMB-1 生物量产生影响的因素, 即铁源、装瓶量、pH 值和温度为试验因素, 进行四因素三水平的正交试验, 结果如表 2 所示。

试验中测量趋磁细菌的生长量选用 OD_{600} 为指标而没有选用每毫升细菌数, 这是因为 OD_{600} 值的测量简便且 OD_{600} 值与一定浓度范围内每毫升细菌数存在线性关系(Schübbe *et al*, 2003)。但为了与其他研究者的优化结果进行对比, 本研究定量了 OD_{600} 值与每毫升细菌数的关系, 试验结果为线性关系 $y = 2.918x -$

$0.332, R^2 = 0.9991$ 。

利用 SPSS 软件对正交试验结果进行直观分析, 所得结果见表 3。

表 2 正交试验结果
Tab.2 Results of the orthogonal experiments

试验号	A	B	C	D	试验结果		
					OD_{6001}	OD_{6002}	OD_{6003}
1	1	1	1	1	0.245	0.248	0.239
2	1	2	2	2	0.401	0.405	0.409
3	1	3	3	3	0.327	0.331	0.323
4	2	1	2	3	0.322	0.333	0.319
5	2	2	3	1	0.270	0.269	0.259
6	2	3	1	2	0.435	0.443	0.439
7	3	1	3	2	0.331	0.350	0.348
8	3	2	1	3	0.360	0.368	0.351
9	3	3	2	1	0.437	0.429	0.438

表 3 正交试验直观分析结果
Tab.3 Results of the orthogonal experiments

因素	水平	平均值	标准差	95%置信区间	
				下限	上限
A	1	0.325	0.002	0.321	0.330
	2	0.343	0.002	0.339	0.348
	3	0.379	0.002	0.375	0.384
B	1	0.304	0.002	0.299	0.308
	2	0.344	0.002	0.339	0.348
	3	0.400	0.002	0.396	0.405
C	1	0.348	0.002	0.343	0.352
	2	0.388	0.002	0.384	0.393
	3	0.312	0.002	0.308	0.316
D	1	0.315	0.002	0.310	0.319
	2	0.396	0.002	0.391	0.400
	3	0.337	0.002	0.333	0.342

由表 3 可知, A 因素的 K_n 值, K_3 最大, 说明其最优水平为 A_3 (奎尼酸铁 0.02mmol/L)。同理, B 因素最优水平为 B_3 (装瓶量 50%), C 因素最优水平为 C_2 (pH 6.7), D 因素最优水平为 D_2 (25)。

利用 SPSS 软件对正交试验结果进行方差分析, 所得结果见表 4。

由表 4 可知, A、B、C 和 D 四个因素对试验结果均有显著影响。最佳组合为 $A_3B_3C_2D_2$, 这个结果与直观分析的结果一致。但是, 考察实际培养情况, 当装瓶量为 50%时, AMB-1 的磁小体生长缓慢, C_{mag} 值降低, 而装瓶量为 75%的时候, OD_{600} 值达到 0.4 以上,

表 4 正交试验方差分析结果

Tab.4 Results of variance analysis of the orthogonal experiments

分析项目	第三类误差平方和	自由度 <i>df</i>	平均方差	<i>F</i> 检验	显著性检验 <i>Sig.</i>
校正模式	0.113	8	1.414E-02	347.775	0.000
截距	3.293	1	3.293	80970.893	0.000
A	1.350E-02	2	6.750E-03	165.986	0.000
B	4.219E-02	2	2.110E-02	518.779	0.000
C	2.611E-02	2	1.305E-02	320.970	0.000
D	3.134E-02	2	1.567E-02	385.363	0.000
误差	7.320E-04	18	4.067E-05		
总计	3.407	27			
总校正	0.114	26			

注: $R^2 = 0.994$

所以 AMB-1 的较佳的培养条件选择奎尼酸铁 0.02 mmol/L, 装瓶量 75%, pH 值 6.7 和 25。

2.2 优化 Cmag 值及优化后 AMB-1 生长曲线

随着传代次数的增加, AMB-1 的 Cmag 值会有所降低。通过 AMB-1 每次传代采用磁收集传代法, 所得菌液在培养箱中培养, 使得 Cmag 值提高。经过 10 代培养, Cmag 值稳定在 1.9—2.0。

AMB-1 的 OD_{600} 值得到提高的同时, Cmag 值也得到提高, 这样的优化对于研究磁小体的形成过程才真正具有意义。此时测量 AMB-1 的生长曲线及 Cmag 值, 结果如表 5 所示。

表 5 AMB-1 生长曲线及 Cmag 值
Tab.5 The Growth curve and the Cmag value

时间(h)	OD_{600}	标准差	Cmag	标准差
0	0.05	0.00	1.520	0.000
6	0.054	0.003	1.540	0.005
12	0.090	0.004	1.590	0.003
20	0.15	0.003	1.760	0.006
24	0.24	0.01	1.877	0.013
36	0.38	0.003	1.980	0.003
48	0.44	0.01	2.143	0.049
72	0.42	0.01	1.985	0.049
96	0.44	0.01	2.047	0.045
120	0.43	0.01	1.987	0.089
144	0.43	0.01	1.979	0.018
168	0.43	0.01	1.873	0.020
192	0.43	0.01	1.877	0.008

2.3 磁小体在 AMB-1 中的变化过程

2.3.1 磁小体在 AMB-1 中的变化

磁小体在趋磁细菌中通常呈链状排列, 通过透射电镜观察发现 AMB-1 菌株培养 24h, 形成沿菌体长轴排列的较小颗粒, 且小颗粒之间间距较大(图 1a); 培养 48h, 磁小体晶体长大并聚集, 形成分段的磁小体链, 沿菌体长轴排列(图 1b); 培养 72h, 晶体进一步成熟且仍为分段磁小体链沿细菌长轴排列(图 1c); 随培养时间延长细菌逐渐衰亡, 培养到 168h 细菌部分自溶, 但磁小体仍以链状排列存在于细菌细胞内(图 1d); 培养到 192h, 菌体自溶, 磁小体随菌体的破碎分散到培养环境中(图 1e)。

2.3.2 不同培养时间磁小体大小分布

不同培养时间磁小体大小分布能反映磁小体形成和变化过程, 通过测量并统计磁小体的大小分布量化磁小体形成和变化过程。统计结果(表 6): AMB-1 菌株培养 24、48、72、96、120、144、168 和 192h, 磁小体分别以 10—20nm (27.03%)、50—60nm (28.42%)、50—60nm (26.53%)、20—30nm (30.23%)、20—30nm (30.25%)、40—50nm (40.71%)、20—30nm (25.40%)和 20—30nm (29.63%)大小的晶体为最多。其中, 培养 24h 磁小体最大不超过 60nm; 培养 48h, 40—50nm 大小的晶体居第二(21.31%); 培养 72h, 40—50nm 大小的晶体居第二(24.49%), 没有小于 20nm 的磁小体; 培养 96h, 没有 10nm 以下的磁小体。

2.3.3 磁小体粒径变化与 Cmag 值变化的比较

磁小体粒径变化以最大出现概率为指标考察磁小体大小变化, 规律为磁小体经历由小变大再由大变小的过程; 以平均磁小体尺寸为指标考察磁小

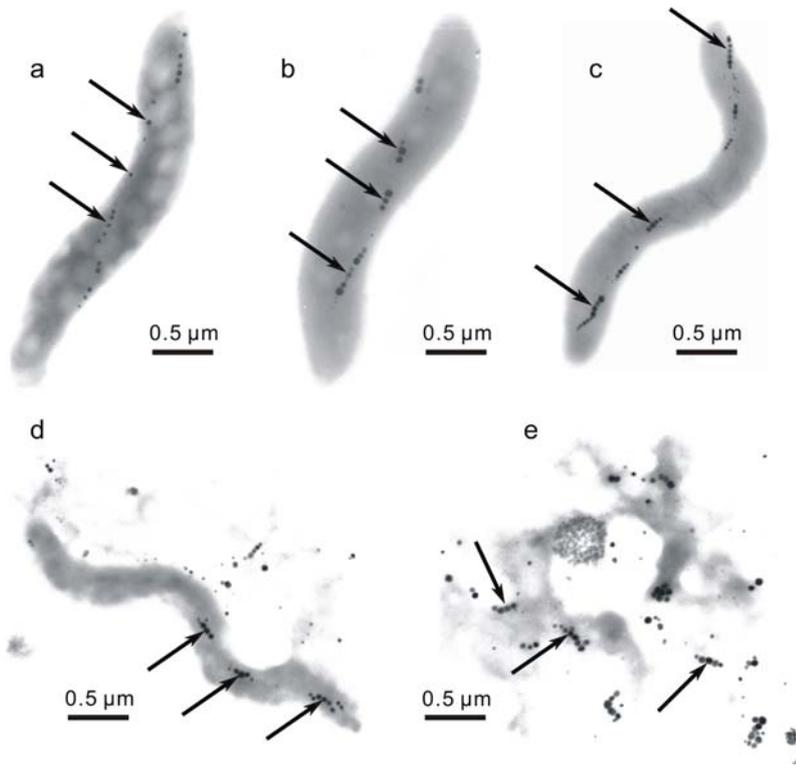


图 1 AMB-1 中不同时间的磁小体排列

Fig.1 Arrangement of magnetosomes in AMB-1 at different cultivating times

a. 沿细菌长轴间距较大排列的磁小体; b. 链状分段排列的磁小体; c. 成熟链状排列的磁小体; d. 部分菌体自溶时的磁小体; e. 分散到环境中的磁小体。箭头所指为磁小体

体大小变化, 规律也为磁小体由小变大再由大变小。从两种粒径指标考察磁小体大小变化, 所得规律一致。

AMB-1 培养过程中 C_{mag} 值的变化呈现出由低变高再由高变低的趋势, 这反映出 AMB-1 带有磁小体的细胞比例由小变大再由大变小。比较磁小体形成过程中的粒径变化与带有磁小体的细胞比例变化规律可知: 开始形成磁小体时, 磁小体较小且有磁小体

的细胞比例较低; 随着磁小体长大并形成磁小体链, AMB-1 有磁小体的细胞比例增加; 磁小体成熟时, AMB-1 有磁小体的细胞比例最多; 之后, AMB-1 逐渐衰亡, 磁小体变小, AMB-1 有磁小体的细胞比例减少(表 7)。

通过从磁小体粒径的变化规律以及 AMB-1 有磁小体的细胞比例(C_{mag} 值)变化规律这两种角度考察磁小体形成过程是一致的。

2.3.4 AMB-1 分裂时磁小体的分离方式 在研究过程中发现: AMB-1 在分裂时磁小体的分配有两种方式, 第一种为磁小体分配到两个子细胞中(图 2a), 第二种为磁小体分配到一个子细胞中(图 2b), 另一个子细胞没有磁小体。没有磁小体的细菌有的会逐渐形成磁小体(图 1a、b、c), 而有的不会形成磁小体, 直至细胞再次分裂(图 2c)。

3 讨论

趋磁细菌 AMB-1 是一株淡水螺菌, 最早由日本学者 Matsunaga 从水体中分离并纯化(Matsunaga *et al.*, 1991)。

AMB-1 具有特异性磁小体, 但是并不是每个细胞都有磁小体, 磁小体的产生比率可以用 C_{mag} 值表示。为了更好地研究磁小体在 AMB-1 生长、分裂及自溶过程中的变化过程, 提高 AMB-1 的 OD_{600} 值以及提高并稳定 C_{mag} 值, 使 AMB-1 菌株及其磁小体达到较佳的生长状态是必不可少的环节。通过优化培养, AMB-1 的生物量达到 1.166×10^9 cells/ml 并且 C_{mag}

表 6 不同培养时间磁小体大小分布

Tab.6 Distributions of magnetosome crystal-size in different cultivating times

时间(h)	不同培养时间磁小体粒径范围(nm)								
	0—10	10—20	20—30	30—40	40—50	50—60	60—70	70—80	80—90
24	9.01%	27.03%	23.42%	23.42%	10.81%	6.31%	—	—	—
48	0.55%	9.84%	15.85%	12.57%	21.31%	28.42%	7.10%	4.37%	—
72	—	—	10.20%	14.29%	24.49%	26.53%	22.45%	2.04%	—
96	—	20.93%	30.23%	20.93%	6.98%	12.79%	8.14%	—	—
120	1.23%	17.28%	30.25%	25.93%	17.90%	3.09%	4.32%	—	—
144	—	0.88%	11.50%	25.66%	40.71%	18.58%	2.65%	—	—
168	—	17.46%	25.40%	15.87%	17.46%	12.70%	7.94%	1.59%	1.59%
192	3.24%	17.13%	29.63%	23.61%	12.50%	9.26%	4.63%	—	—

表 7 磁小体粒径变化与 Cmag 值比较

Tab.7 Relationships between Cmag and magnetosome crystal-size of maximum frequency, or average crystal-size

时间(h)	磁小体平均大小(nm)	出现频率最高的粒径范围(nm)	Cmag 值
24	27.87	10—20	1.62
48	43.45	50—60	1.75
72	50.31	50—60	1.72
96	34.36	20—30	1.73
120	30.92	20—30	1.71
144	42.29	40—50	1.68
168	37.62	20—30	1.65
192	33.12	20—30	1.63

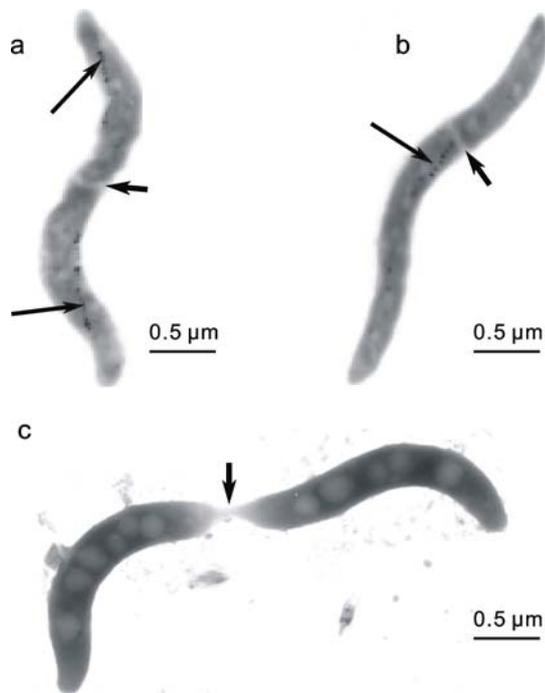


图 2 细菌分裂磁小体采用不同的分离方式

Fig.2 Different separation modes of magnetosomes in dividing AMB-1 cells

- a. 磁小体分配到两个子细胞; b. 磁小体只分配到一个子细胞;
c. 子细胞无磁小体。长箭头所指为磁小体, 短箭头所指为分裂痕迹

值稳定于 1.9—2.0。有研究者认为 Cmag 值稳定于 1.7 即不影响对磁小体行为的研究(Schübbe *et al*, 2003), 但作者认为, 对于磁小体形成过程的研究, 有必要将 Cmag 值提高, 这样更有利于对 AMB-1 中磁小体进行观察, 避免由于具有磁小体的 AMB-1 细胞不足而造成假象。

Matsunaga 等(1996)曾对 AMB-1 生物量的提高进行研究, 他们发现氧气对 AMB-1 的生长及磁小体形

成有影响, 好氧条件可以加速 AMB-1 生长。好氧条件下 AMB-1 的生物量(8.0×10^8 cells/ml)几乎是微好氧条件下(4.2×10^8 cells/ml)的两倍, 但是好氧条件影响磁小体的形成。作者在优化 AMB-1 的培养条件时也发现了这个现象。作为磁小体形成过程研究的试验材料, 不仅需要充足的生物量, 同时必须考虑趋磁细菌的带有磁小体细胞的比例。

Yang 等(2001)在 10L 发酵罐中对 AMB-1 生物量及磁小体产量的提高进行研究, 细菌细胞产量为 1.51×10^9 cells/ml, 但具有磁小体细胞比例约为 53%; 王小柯等(2007)通过培养瓶培养 AMB-1, 细胞数量为 4.24×10^8 cells/ml, 100% 的细菌细胞内具有磁小体(Cmag 值为 2.3)。作者通过培养瓶对 AMB-1 的优化培养, 既考虑细胞数量(1.166×10^9 cells/ml), 又兼顾带有磁小体细胞的比例(95%左右, Cmag 值稳定于 1.9—2.0)。

由于 AMB-1 生长缓慢, Matsunaga 等(1991)在对 AMB-1 的生长进行研究时, 选用的时间间隔为 24h, 本文在对 AMB-1 进行研究时选用的时间间隔与其一致。作者对磁小体形成过程的研究, 是在特定培养条件下(最优培养条件)的研究, 由于 AMB-1 生物量以及带有磁小体细胞比例均较佳, 从而避免了试验材料的原因造成假象。

氧气可以加速 AMB-1 的生长, 但是好氧条件导致部分 AMB-1 细胞不产磁小体而无磁性(Matsunaga *et al*, 1991)。因此作者在优化 AMB-1 生长条件时将氧气作为考察指标之一。作者在研究 AMB-1 磁小体的形成过程时, 采用培养瓶静止培养法, 通过装瓶量来控制初始氧浓度。当装瓶量为 95% 时, 培养瓶中溶解氧浓度为 1.717mg/L; 75% 时, 溶解氧浓度为 2.227mg/L; 50% 时, 溶解氧浓度为 6.065mg/L。考虑到氧气虽可促进 AMB-1 生长, 但对磁小体形成不利, 兼顾二者, 作者选择 75% 装瓶量作为培养条件。使得培养瓶中初始氧浓度较低(水体中溶解氧的浓度低于 2mg/L, 被认为水体处于低氧区)(李道季等, 2002), AMB-1 带有磁小体细胞比例较高(Cmag 值稳定于 1.9—2.0), 又保证 AMB-1 具有较高的生物量(1.166×10^9 cells/ml)。

优化 AMB-1 培养条件后, 对 AMB-1 磁小体形成过程进行研究。研究 AMB-1 的磁小体形成过程对于研究原核细胞的细胞器具有理论意义, 并且可以为研究原核细胞的细胞器提供证据。对比其它的趋磁细菌菌株如 MSR-1, AMB-1 菌株的磁小体链与之有所

区别: MSR-1 磁小体为一条沿着细胞长轴排列的长链 (Scheffel *et al*, 2006), 而 AMB-1 中磁小体链分段排列于细菌长轴(图 1b)。通过透射电镜观察发现, 磁小体在 AMB-1 中不是一开始就成链排列, 而是间距较大地沿细菌长轴排列于细菌中, 随着细菌的生长, 磁小体晶体逐渐长大并排列成较长的磁小体链(图 1a、b、c)。AMB-1 中磁小体链并不是一条很长的链, 而是形成一段一段的相对较短的磁小体链。培养 24h, 磁小体以较小的晶体居多(10—20nm), 随着培养时间延长, 磁小体长大(50—60nm)。培养 72h 开始分裂, 72h 后统计的磁小体是一部分刚开始生长的磁小体和另一部分逐渐变小的磁小体的混合。但是, 随着培养时间的延长, 磁小体总体趋势仍然表现出变小态势。所以, 磁小体在 AMB-1 中经历了一个由小变大, 再变小的过程。直至培养到 192h, 细菌自溶, 磁小体随着菌体的破碎释放到环境当中去。Devouard 等(1998)曾报道过 AMB-1 的磁小体分布为向右倾斜的峰状图, 且以 40—50nm 大小的为最多。这与本研究 48h 及 72h 的分布一致, 但最大出现概率的磁小体大小比本研究的小。这可能是由于 Devouard 等(1998)研究 AMB-1 的磁小体分布选用的取样时间点与本文不同造成的。AMB-1 的磁小体随着细菌的生长或衰亡有所变化, 这就使得不同的取样时间, 观察到的磁小体大小有区别。

研究磁小体粒径变化, 发现其表现为两次由小变大, 再由大变小, 这说明在趋磁细菌生命过程中磁小体经历了由小变大的形成过程和由大变小的衰亡过程。实际上磁小体的变化过程是一次, 即磁小体经历由小变大再变小。由于细胞的不同步培养, 让人们看到了两次这个过程, 也就是原来的细菌细胞磁小体经历这个过程, 新的子细胞也同样经历这个过程, 从而印证了这个过程的真实存在。

磁小体随着细菌的自溶释放到环境当中去这种现象的发现, 对于方便地获得磁小体晶体具有价值。通过深入研究摸索出使 AMB-1 快速自溶磁小体分散到环境中的条件, 或许可以找到获得磁小体的新方法, 即不用破碎细菌细胞而是从培养基中直接收集磁小体。

Scheffel 等(2007)对 MSR-1 进行研究时发现, MSR-1 在分裂时磁小体分配到两个子细胞中。而作者在研究 AMB-1 时发现, 磁小体随 AMB-1 的分裂采用两种不同的分裂方式, 即一种为磁小体分配到两个子细胞中, 另一种为磁小体只分配到一个子细胞中。

MSR-1 与 AMB-1 的磁小体在分裂时表现出不完全相同的规律, 这可能是由于 MSR-1 中的磁小体链为一条长链, 而 AMB-1 为分段的磁小体链。在母细胞分裂时, MSR-1 需要能量将磁小体长链断开后分配到子细胞中, 而 AMB-1 由于母细胞中的磁小体链为分段排列, 分裂时不必耗费能量将磁小体链断开, 可以直接将磁小体链分配到子细胞。但是, 正是由于 AMB-1 分裂时磁小体链不必断开, 使得分裂时有些子细胞没有得到磁小体链。这或许也可以说明趋磁细菌为原核生物, 磁小体作为原核生物的细胞器并不能像真核生物的细胞器那样一代一代稳定地遗传下去。分裂时没有得到原核细胞器的细菌, 在下一代大多数能够重新生成, 但是少数细菌会永久地失去原核细胞器。只有当原核生物进化成真核生物时细胞器才能够稳定地遗传。由于分裂方式导致磁小体的逐渐丢失, 这种现象的发现解释了 AMB-1 随着培养时间及传代次数的增加磁小体 C_{mag} 值会有所下降。AMB-1 磁小体不同分离方式的发现, 对推测不同趋磁细菌磁小体的分离方式奠定了基础。

致谢 本研究中透射电镜观察所需铜网的镀膜及样品的制备、AMB-1 磁小体大小的测量方法均得到了法国汉斯大学物理系张葵教授的指导, 法国科研中心吴龙飞研究员和中国科学院海洋研究所张武昌研究员在本文的修改过程中提出很多宝贵意见, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王小柯, 赵露泽, 宋 涛等, 2007. 脉冲磁场对趋磁螺细菌 AMB-1 磁小体形成及相关基因表达的影响. 高技术通讯, 4(17): 412—417
- 孙建波, 姜 伟, 李 颖等, 2007. 细菌纳米磁小体有望作为靶向药物载体. 微生物学通报, 34(1): 165—168
- 李道季, 黄大吉, 2002. 长江口外氧的亏损. 中国科学(D 辑), 32(8): 686—694
- 范国昌, 钱凯先, 1998. 趋磁细菌及其磁小体的研究与应用. 生物技术通报, 2: 24—28
- 贾蓉芬, 彭先芝, 高梅影等, 2001. 中国黄土剖面趋磁细菌的组成特征与生态意义. 岩石矿物学杂志, 20(4): 428—432
- 高 峻, 肖 天, 孙 松等, 2004. 新型海洋趋磁细菌 YSC-1 的分离及其特异性磁性纳米材料磁小体的研究. 高技术通讯, 14(5): 44—47
- Bazylinski D A, 1999. Synthesis of the bacterial magnetosome: the making of a magnetic personality. *International Microbiology*, 2(2): 71—80
- Bazylinski D A, Frankel R B, 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3): 217—230

- Bazylnski D A, Frankel R B, Heywood B R *et al*, 1995. Controlled biomineralization of magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) in a magnetotactic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3232—3239
- Bazylnski D A, Schlezinger D R, Howes B H *et al*, 2000. Occurrence and distribution of diverse populations of magnetic protists in a chemically stratified coastal salt pond. *Chemical Geology*, 169(3): 319—328
- Blakemore R P, 1975. Magnetotactic bacteria. *Science*, 190(4212): 377—379
- Blakemore R P, Maratea D, Wolfe R S, 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *Bacteriol*, 140(2): 720—729
- Devouard B, Pósfai M, Hua X *et al*, 1998. Magnetite from magnetotactic bacteria: size distributions and twinning. *American Mineralogist*, 83(11—12): 1387—1398
- Fbrahim-Nesbat F, Tiedemann S, Albrecht S *et al*, 1990. Electron microscopical studies of poplar clones inoculated with *Xanthomonas populi* subsp. *populi*. *Eur J For Path*, 20(6—7): 367—375
- Flies C B, Jonkers H M, Beer D *et al*, 2005. Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2): 185—195
- Friedmann E I, Wierzchos J, Ascaso C *et al*, 2001. Chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: Evidence of biological origin. *PNAS*, 98(5): 2176—2181
- Grü nberg K, Wawer C, Teb B M *et al*, 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Applied Environment Microbiology*, 67(10): 4573—4582
- Lins U, Freitas F, Keim C N *et al*, 2003. Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(2): 111—116
- Matsunaga T, Sakaguchi S, Tadokoro F, 1991. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Applied Microbiology Biotechnology*, 35(5): 651—655
- Matsunaga T, Tsujimura N, Kamiya S, 1996. Enhancement of magnetic particle production by nitrate and succinate fed-batch culture of *Magnetospirillum* sp. AMB-1. *Biotechnology Techniques*, 10(7): 495—500
- Schübbe S, Kube M, Scheffel A *et al*, 2003. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals large deletion comprising a putative magnetosome island. *Journal of Bacteriology*, 185(19): 5779—5790
- Schüler D, Frankel R B, 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52(4): 464—473
- Schüler D, Uhl R, Bäuerlein E, 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiology Letters*, 132(1—2): 139—145
- Scheffel A, Gruska M, Faivre D *et al*, 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, 440(7080): 110—114
- Scheffel A, Schüler D, 2007. The Acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly. *Journal of Bacteriology*, 189(17): 6437—6446
- Thomas-Keprta K L, Bazylnski D A, Kirschvink J L *et al*, 2000. Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(23): 4049—4081
- Thomas-Keprta K L, Clemett S J, Bazylnski D A *et al*, 2001. Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: Presumptive biosignatures. *PNAS*, 98(5): 2164—2169
- Thomas-Keprta K L, Clemett S J, Bazylnski D A *et al*, 2002. Magnetofossils from Ancient Mars: a Robust Biosignature in the Martian Meteorite ALH84001. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3663—3672
- Weiss B P, Kim S S, Kirschvink J L *et al*, 2004. Magnetic tests for magnetosome chains in Martian meteorite ALH84001. *PNAS*, 101(22): 8281—8284
- Yang C D, Takeyama H, Tanaka T *et al*, 2001. Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(1): 13—19
- Zhao L Z, Wu D, Wu L F *et al*, 2007. A simple and accurate method for quantification of magnetosomes in magnetotactic bacteria by common spectrophotometer. *J Biochem Biophys Methods*, 70(3): 377—383

OBSERVATION OF THE ASSEMBLING PROCESS OF MAGNETOSOME AND OPTIMIZATION OF THE CULTURING CONDITIONS

ZHANG Yu-Hong^{1,2}, WU Hong-Qing^{1,3}, XIAO Tian¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Liaoning Province Key Laboratory of Basin Pollution Control, Liaoning Academy of Environmental Sciences, Shenyang, 110031; 3. School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin, 300130)

Abstract Orthogonal experimental design was used to optimize growth conditions of magnetosome in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. Iron resource, volume, pH and temperature were chosen as influencing factors to optimize the growth condition of *M. magneticum* AMB-1. The optimal growth conditions were ferric quinine 0.02mmol/L, 75% occupation of the bioreactor, pH 6.7 and 25 °C; and cells were harvested at OD_{600} 0.44 (cell density, 1.166×10^9 cells/ml). Cmag value was used to characterize the magnetite in magnetotactic bacterial cells. *M. magneticum* AMB-1 cells were collected by magnet before inoculation. After magnetic enrichment and cultivation for ten generations, Cmag value was stabilized at 1.9—2.0. Magnetosome assembling was observed under Transmission Electron Microscope. Small crystals appeared after a 24-h cultivation. At 48h, crystals grew larger and assembled into chains along the long axis in subsections. At 72h, crystals matured and still arranged along the long axis in subsections. At 168h, crystals in liner magnetosome chains were observed in partly-autolyzed cells. At 192h, magnetic cells were fully autolyzed, and magnetosome chains were released to culture medium. Two magnetosome separation modes in dividing *M. magneticum* AMB-1 cells were observed. One was symmetric separation of magnetosome into daughter cells. The other was asymmetric separation, and only one daughter cell was the heritor of magnetosome. Part of the non-magnetosome daughter cells could produce magnetosome later, but part of non-magnetosome daughter cells might never produce magnetosome, even after they divided again.

Key words Magnetotactic bacteria, Magnetosomes, Optimizing culturing, Functional Materials