

亚硝酸盐对生孢梭菌 细胞产量和超微结构的影响

董庆利^{1,2}, 屠康², 刘宝林¹, 李保国¹

(1. 上海理工大学食品与生物技术研究所, 上海 200093;

2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为研究亚硝酸盐抑菌机理, 在生孢梭菌对数生长期添加不同量的亚硝酸盐 (0、100、200、300、400 和 500 mg · L⁻¹), 收集亚硝酸盐作用约 20h 的生孢梭菌细胞, 发现生孢梭菌细胞产量显著降低, 应用透射电镜观察发现, 添加亚硝酸盐后生孢梭菌超微结构发生显著变化, 如细胞壁破裂、变薄或消失, 胞浆内容物溶解或流失等。推论认为亚硝酸盐对梭菌细胞的侵害是其抑菌机理之一。

关键词: 亚硝酸盐; 生孢梭菌; 透射电镜

Effects of Nitrite on Cell Yield and Ultrastructure of *Clostridium Sporogenes*

Dong Qing-li^{1,2}, Tu Kang², Liu Bao-lin¹, Li Bao-guo¹

(1. Institute of Food and Biological Technology, University of Shanghai for Science and Technology Shanghai 200093;

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095)

Abstract: In order to study the bacteriostasis mechanisms of nitrite, different nitrite concentrations (0, 100, 200, 300, 400 and 500 mg · L⁻¹) were added into culture medium of *C. sporogenes* at lag phase of growing. It indicated that the cell yields of *C. sporogenes* decreased significantly with nitrite concentrations increased. Moreover, the cell ultrastructures were destroyed seriously from the observations of transmission electron microscope after nitrite addition for about 20h. As a result, cell breakage would be one of reasons of nitrite inhibition on bacteria.

Key words: Nitrite; *C. sporogenes*; TEM

中图分类号: TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123(2008)07-0023-04

亚硝酸盐是肉制品中常用的食品添加剂, 具有发色、抑菌、抗氧化、改善质构等作用, 特别是食品工业中危害最大的有害菌之一肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*) 最有效的抑菌剂, 研究中常用不产毒素的产芽孢梭状芽孢杆菌

(*C. sporogenes*, 简称生孢梭菌) 作为研究替代菌, 其生理生化特性与蛋白水解型肉毒梭菌 B、E 和 F 种相似, 本身也能引起食品的腐败^[1,2]。

亚硝酸盐因其本身具有毒性, 同时亚硝酸盐作为前提物生成的 N-亚硝基化合物具有致突变和

收稿日期: 2008-04-28

作者简介: 董庆利(1979-), 山东临沂人, 博士, 讲师, 主要从事畜产品安全与质量控制方面的研究工作。021-55271117; E-mail: dongqingli@126.com

致癌性,其安全性使用问题一直备受关注^[3]。除亚硝酸盐替代物和N-亚硝基化合物抑制剂的研究外,亚硝酸作用机理,特别是抑菌作用机理,是这些研究的前提和理论基础,虽然已有不同的假说提出^[4],但抑菌作用特别是抑制梭菌属生长和毒素产生的机制有待于明确。

在细胞水平上,亚硝酸盐对梭菌属的作用研究主要集中在对细胞壁和细胞膜的破坏上,如Joannou发现产生孢梭菌在某些亚硝基复合物如Roussin黑盐(Roussin's black salt, RBS)和硝普盐(Sodium nitroprusside, SNP)存在下,其细胞发生部分消散^[5],但亚硝酸盐对生孢梭菌细胞的破坏形态并未清晰。因此,本文研究不同浓度(0~500mg·L⁻¹)的亚硝酸盐对生孢梭菌细胞产量的影响,并应用透射电镜(Transmission Electron Microscope, TEM)观察亚硝酸盐对生孢梭菌细胞超微结构的影响,探讨亚硝酸盐细胞水平上的抑菌作用,为最终合理解决“亚硝酸盐问题”提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 生孢梭菌的培养及菌液制备

生孢梭菌真空干燥粉购自中国普通微生物菌种保藏中心(菌号1.2157)。应用TYGA液体培养基(胰酪蛋白胨1.5%,氯化钠0.25%,酵母浸出粉0.5%,葡萄糖0.5%,L-半胱氨酸盐酸盐0.05%,硫乙醇酸钠0.05%,刃天青0.001%,琼脂0.05~0.07%)37℃下培养。在生孢梭菌培养至指数生长期(约4h)时分别添加0~500mg·L⁻¹的亚硝酸钠(分析纯,AR),继续培养至24h。

1.2 细胞产量的计算

取生孢梭菌24h培养液1mL,应用TDL-40型低速台式离心机5000rpm离心5min,弃去上清,保留菌体,用0.5mol·L⁻¹pH 6.5磷酸缓冲液(PBS)洗涤三次,再加1mL前述PBS缓冲液,离心,生孢梭菌的细胞产量(Cell yield)计算方法参照Payne等^[6]的定义:每单位体积培养基收集得到的细菌细胞湿重(mg·L⁻¹)。

1.3 透射电镜观察

参照周立勤等^[7]的方法,略有修改。将分别添加0、100、300和500mg·L⁻¹亚硝酸钠的生孢梭菌24h培养液,按上述方法离心制得细胞,迅速置于4℃预冷的4%的戊二醛(C₅H₈O₂)中固定2h,确保细菌浓度高于10⁸CFU·mL⁻¹。然后用配制固定液的0.2mol·L⁻¹PBS缓冲液每隔20min清洗三次,

再用0.1~0.2%的锇酸(O₃O₄)固定液再次固定,用PBS缓冲液再清洗三次。然后分别用30%、50%、70%、80%、90%和100%的乙醇梯度脱水,以避免防止脱水引起的细胞收缩,每个浓度脱水时间为15min,为了保证充分脱水,100%乙醇脱水要连续操作3次。用环氧丙烷浸渍10h以上,用Epon812树脂对样品进行包埋,置于恒温箱,Epon树脂聚合条件为:在35℃、45℃和60℃分别加温12h、12h和24h。然后超薄切片保证切片厚度为40~90nm,继而分别用50%乙醇配置的1~3%醋酸铀染色20~90min、柠檬酸铅染色30min。透射电镜样品观察应用日立E-1010型离子发射器和日立Hitachi H-7650型透射电镜。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐对生孢梭菌细胞产量的影响

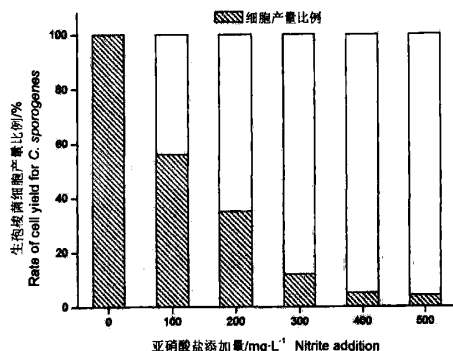


图1 不同亚硝酸盐添加量的生孢梭菌细胞产量比例
Fig.1 Rates of cell yields for *C. sporogenes* affected by different nitrite additions.

如图1,在生孢梭菌指数生长期添加不同量的亚硝酸盐(0、100、200、300、400和500mg·L⁻¹),培养结束计算生孢梭菌的细胞产量显示,添加量越大,细胞产量越低(与对照的100%的细胞产量的比例相比),特别是400和500mg·L⁻¹的两组生孢梭菌的细胞产量分别降至不添加的对照组的5%和4%,表明生孢梭菌的生长已经受到了显著抑制。这与Payne等^[6]的研究结果类似,后者将亚硝酸盐添加量从1mmol·L⁻¹升至4mmol·L⁻¹时,生孢梭菌的细胞产量降至64%(以1mmol·L⁻¹的细胞产量为100%计)。

试验中还发现,亚硝酸盐添加量从200至500mg·L⁻¹的四组,生孢梭菌培养结束后收集细胞时,离心后的沉淀物均不同程度的形成较深颜色的凝聚物,难以继续用PBS冲洗再离心,推测可能是亚硝酸盐与生孢梭菌反应生成的不溶物,同

时阻碍了细菌的进一步生长和最后的细胞产量。O' Leary 和 Solberg^[8]研究亚硝酸盐对产气梭菌 (*C. perfringens*) 的抑制作用时也发现,亚硝酸盐添加量为 $14\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细菌沉淀物呈现深灰或深棕色,难以在缓冲液中分散,他们认为这种颜色主要体现在细胞壁和细胞膜上,是细胞凋亡的开始。

2.2 亚硝酸盐对生孢梭菌细胞超微结构的影响

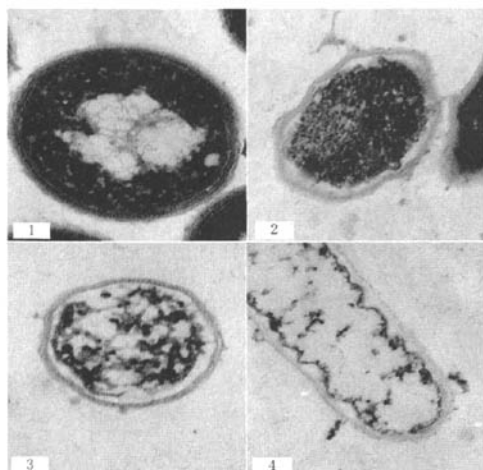


图2 不同亚硝酸盐添加量的生孢梭菌细胞透射电镜图 (1~4 中分别为 0、100、300 和 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸盐, $D=200\text{nm}$)

Fig. 2 Graphs of TEM of *C. sporogenes* cells affected by different nitrite additions.

由图2透射电镜图可知,随着亚硝酸盐添加量的增加,生孢梭菌细胞的超微结构发生了显著变化,未添加亚硝酸盐的生孢梭菌细胞(图2-1)饱满,细胞壁、细胞膜完整,细胞器丰富,细胞核较大,基本上呈圆形,核膜薄,且结构完整;当添加 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚硝酸盐后,生孢梭菌细胞(图2-2)的细胞壁部分缺失,细胞膜肿胀,内部的细胞器变得松散,细胞内的电子密度降低,细胞核基本消失;这种趋势在添加 $300\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图2-3)和 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图2-4)亚硝酸盐后更加明显,特别是后者,在亚硝酸盐作用约20h后,生孢梭菌细胞的细胞壁完全缺失,胞浆萎缩,细胞器几乎全部漏失。

试验结果与 Yamauchi 等^[9]的研究相似,前者推论认为亚硝基化合物作用在细菌的细胞壁上,如一些阳离子的肽,从而导致细胞出现水泡现象,破坏细胞的结构完整性,直至出现迅速的细胞消散。同时也证明了亚硝酸盐与 Joannou^[3]研究中的亚硝基复合物的作用结果相近,生孢梭菌

在低浓度时出现水泡,高浓度时发生消散,推论认为亚硝酸盐对细菌细胞的侵害也是其抑菌机制之一。

3 讨论

3.1 亚硝酸盐抑菌研究的添加剂量

本实验中抑菌研究使用的亚硝酸盐添加量应高于实际食品工业中的添加量(如国标中的 $150\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和美国农业部的 $156\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),主要原因是实际食品环境中梭菌属的生长比实验室培养基条件下相对更困难,而实验室培养基的条件更宽松,更有利于梭菌的生长;参照前人研究,亚硝酸盐对梭菌属在液体培养基中抑制的含量通常在 $440\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (pH7.0)到 $700\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (pH7.5)之间^[6,8]。因此,本试验设计了 $0 \sim 500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚硝酸盐添加量,对生孢梭菌指数生长期抑制作用的结果表明,亚硝酸盐在液体培养基环境下 $300 \sim 500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 已经显著的抑制了其生长(细胞含量的降低),这与实际食品环境下 $100 \sim 150\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度相类似。

3.2 亚硝酸盐对梭菌属细胞的抑制作用

本文研究发现对数生长期的生孢梭菌添加亚硝酸盐后,其细胞产量和超微结构发生了显著变化。Joannou^[3]和 Yamauchi 等^[9]的研究也得到了相似结果。芽孢杆菌的细胞壁上有 DL-二氨基庚二酸盐和半乳糖,在电镜下观察,它属于典型的革兰氏阳性菌,有一个无定形的电子密集的内层,和一个排列规则的具有圆柱形亚组(通常指的是 Slayer)的外层。Slayer 蛋白分子量是40到200kDa,从艰难梭菌 (*C. difficile*) 中已分离出32kDa和45kDa两种蛋白^[10]。

亚硝酸盐对梭菌细胞壁和细胞膜的侵害,是亚硝酸盐产生抑制作用的原因之一,一般通过抑制细胞壁的单体或它们的多聚合物以抑制细胞壁的合成,改变细胞的渗透性,削弱营养成分通过细胞的运输,或者使细胞成分流失。但是,对细胞壁的破坏通常不能杀死细菌的细胞,反而增加渗透性会增加有毒种群的进入。O' Leary 和 Solberg^[8]、Payne 等^[6]的研究结果都支持这种观点。

另外,亚硝酸盐对需氧菌细胞壁和细胞膜的作用不如梭菌显著,如 Buchman 和 Hansen^[11]将硝普盐(SNP)分别添加到生孢梭菌和单核增生李斯特菌的培养基中,只有生孢梭菌的细胞被严重破坏,推论认为亚硝酸盐只对生孢梭菌的侵害作用是与细菌的细胞膜巯基基团的钝化有关。相关理论的证实需要进一步深入研究。

4 结论

添加亚硝酸盐后,对数生长期的生孢梭菌细胞产量显著降低,超微结构发生显著变化,如细胞壁破裂、变薄或消失,胞浆内容物溶解或流失等。亚硝酸盐对生孢梭菌细胞的强烈侵害是其抑菌机理之一。

参考文献

- [1] Lund B M, Peck M W. The Microbiological Safety and Quality of Food [M]. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc, 2000: 1057—1109.
- [2] Dong Q, Tu K, Guo L, et al. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. *Food Microbiology*. 2007, 24(6): 624—632.
- [3] Cassens R. G. Composition and safety of cured meats in the USA [J]. *Food Chemistry*, 1997, 59(4): 561—566.
- [4] 董庆利, 屠康. 腌制肉中亚硝酸盐抑菌机理的研究进展[J]. *现代生物医学进展*. 2006, 6(3): 48—52.
- [5] Joannou C. Characterization of the bactericidal properties of sodium nitroprusside and other pentacyanonitrosyl complexes on the food—spoilage bacterium *Clostridium sporogenes* [J]. *Applied and Environment Microbiology*. 1999, 64: 3195—3201.
- [6] Payne M J, Woods L F J, Gibbs P, et al. Electron paramagnetic resonance spectroscopic investigation of the inhibition of the phosphoroclastic system of *Clostridium sporogenes* by nitrite [J]. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136: 2067—2076.
- [7] 周立勤, 王汉敏, 陈林娜, 等. 透射电镜下中药制剂对耐药菌株的抑菌作用观察[J]. *湖北中医学院学报*, 2006, 8(1): 13—16.
- [8] O' Leary V, Solberg M. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens* [J]. *Applied and Environment Microbiology*. 1976, 31: 208—212.
- [9] Yamauchi K, Tomita M, Giehl T G, et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin—derived lactoferrin peptide fragment [J]. *Infection and Immunity*. 1993, 61: 719—728.
- [10] Takeoka A, Takumi K, Koga T, et al. Purification and characterization of S layer proteins from *Clostridium difficile* GAI 0714 [J]. *Journal of General Microbiology*. 1991, 137: 261—267.
- [11] Buchman G W., Hansen J N. Modification of membrane sulfhydryl groups in bacteriostatic action of nitrite [J]. *Applied and Environment Microbiology*. 1987, 53: 79—82.