

文章编号: 1004-0374(2010)09-0878-08

## 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展

程 琴<sup>1,2</sup>, 黄庶识<sup>1\*,2</sup>, 陈丽梅<sup>1\*</sup>

(1 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224; 2 广西科学院生物物理实验室, 南宁 530007)

**摘 要:** 芽孢杆菌休眠孢子的萌发是孢子恢复到营养生长的第一个决定性步骤。孢子被营养性萌发剂和各种非营养信号诱导而萌发恢复到营养细胞状态。芽孢萌发后就丧失了对外界胁迫的抵抗力。该文主要从芽孢萌发信号传导、营养萌发受体、萌发中的离子通道、皮层溶解酶的功能、非营养诱导萌发和萌发途径等方面阐述芽孢杆菌孢子萌发机理的进展, 并对其前景作了简要评述。

**关键词:** 芽孢杆菌; 孢子萌发; 机理

**中图分类号:** Q935; Q937 **文献标识码:** A

## Research advances on the germination mechanism of *Bacillus* spores

CHENG Qin<sup>1,2</sup>, HUANG Shu-shi<sup>1\*,2</sup>, CHEN Li-mei<sup>1\*</sup>

(1 Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; 2 Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract:** The germination of *Bacillus* spores is the first step to return the vegetative growth, and is induced by nutrients and a variety of non-nutrient agents, and spores completely lose resistance to outer stress after germination. This paper introduced the signal transduction of spores germination, receptors of nutrient germinants, ion fluxes in germination, the role of cortex lytic enzymes, nonphysiological germination and the latest research progress of spores germination pathway.

**Key words:** *Bacillus*; spores germination; mechanism

芽孢杆菌的芽孢(内生孢子或称孢子)是芽孢杆菌营养细胞受到营养缺乏或代谢产物积累, 或温度变化等外部环境因子的触发而形成的休眠体。产生芽孢的杆状细菌主要有芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属和芽孢乳杆菌属。芽孢对辐射、热、干燥、极端 pH 值、静水压和一些有毒化学物品等有很强的抵抗能力<sup>[1]</sup>; 在一定条件下, 芽孢在休眠状态下可以保持活力数年至数十年之久。芽孢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, 芽孢就开始萌发、出芽生长, 恢复到营养细胞状态<sup>[2]</sup>。芽孢的萌发是芽孢杆菌从芽孢成长为营养体的第一步, 芽孢萌发后就丧失了对外界胁迫的抵抗力。

自然界中的芽孢能对一些称之为萌发剂(germinants)的营养性物质产生响应而萌发。通常, 这些营养性物质包括单氨基酸、糖类、嘌呤核苷等, 但

也有一些化学混合物也可以触发芽孢的萌发, 如用天门冬氨酸、葡萄糖、果糖和氯化钾配成的混合剂(AGFK)可以用来作为枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)芽孢萌发的萌发剂<sup>[2]</sup>。芽孢和促进萌发的萌发剂混合后数秒钟之内, 萌发剂快速跨过芽孢衣和皮层到达芽孢内膜的表面, 与位于芽孢内膜上的受体蛋白(receptors, 如GerA、GerB、GerK receptors等)相互作用, 有可能通过称之为GerC-type、GerD-type

收稿日期: 2010-02-11; 修回日期: 2010-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30860010); 广西自然科学基金项目(桂科回0832006); 广西科研院所基本科研业务费资助项目(08YJ16WL01)

\*通讯作者: 黄庶识, E-mail: hshushi@yahoo.com.cn; 陈丽梅, E-mail: chenlimeikm@yahoo.com.cn; Tel: 0771-2503990

等蛋白质传导芽孢萌发的信号, 激发芽孢进入萌发状态, 接着启动一连串萌发事件, 之后的萌发过程不会因移走萌发剂而停止。

除了营养萌发剂外, 孢子在其他因子, 如溶菌酶、盐、高压、2, 6 吡啶二羧酸钙( $\text{Ca}^{2+}$ -DPA) 以及阳离子表面活性剂, 如十二烷胺等作用下也会触发其萌发<sup>[3]</sup>。这些非营养性因子触发孢子萌发是非生理性的, 但它们所触发孢子的萌发途径和营养性萌发剂触发的萌发途径是关联的。另外, 从一个孢子释放出来的  $\text{Ca}^{2+}$ -DPA 可能刺激其他相邻孢子的萌发。Setlow<sup>[4]</sup> 研究报道, 除了营养性萌发剂与孢子内膜蛋白受体作用触发杆菌孢子的萌发外, 细胞壁肽聚糖通过与内膜蛋白激酶结合也能引起孢子的萌发。

芽孢萌发最早的事件牵涉到芽孢膜透性的变化, 意味着芽孢膜流动性增加, 随后的萌发过程经历以下两个阶段(图 1)。第一阶段: (1)  $\text{H}^+$ 、单价阳离子( $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ ) 和  $\text{Zn}^{2+}$  释放到芽孢外面, 释放  $\text{H}^+$  使芽孢核内的 pH 值从 6.5 提高到 7.7<sup>[5]</sup>, 该 pH 值对于满足芽孢核内酶活动所需的含水量是必要的; (2) 占芽孢干重 5%~15% 的  $\text{Ca}^{2+}$ -DPA 的释放, 芽孢折光性逐渐消失; (3) 芽孢核内  $\text{Ca}^{2+}$ -DPA 被水置换, 含水量增加, 导致芽孢抵抗湿热能力降低<sup>[6, 7]</sup>。第二阶段: (1) 芽孢皮层内肽聚糖的水解, 有可能是从芽孢核内释放的  $\text{Ca}^{2+}$ -DPA 激活细胞溶解酶(CWLJ 和 SLeB) 来水解肽聚糖 (2) 芽孢核进一步摄取水分而膨胀, 胞壁也跟着肿胀<sup>[6]</sup>, 随着芽孢核水合化程

度的提高, 芽孢核内蛋白质恢复流动性, 酶的活性也得到恢复, 这时芽孢失去其休眠特性。在第二阶段完成后, 相关酶的活力得到恢复, 启动芽孢后续的系列代谢活动, 随后是细胞大分子物质, 如 RNA、蛋白质、DNA 等的合成, 芽孢转到细胞的生长阶段(spore outgrowth), 逐渐生长成一个新的营养细胞。在芽孢萌发过程中没有发现营养性萌发剂的大规模跨膜运输和萌发剂被代谢的证据, 也没有发现有能量代谢的实验证据, 芽孢萌发过程牵涉到膜透性和酶活性的变化, 本质上是一个生物物理的过程<sup>[8]</sup>。

近 30 年来, 随着现代生物技术的广泛应用, 以枯草芽孢杆菌为模式菌株对芽孢的萌发机制开展了大量而深入的研究<sup>[10]</sup>, 有关芽孢萌发的研究也成为了研究热点, 本文主要从芽孢萌发信号转导、营养萌发受体、萌发中的离子通道、皮层溶解酶和非营养性萌发等方面阐述芽孢杆菌孢子萌发机理的进展。

### 1 萌发剂触发孢子萌发的早期事件——信号转导过程

芽孢萌发过程包括化学萌发剂和特定的受体在孢子内的相互作用, 以某种方式进行信号的转导, 但孢子萌发的信号转导分子机制还不清楚。根据已有的实验证据, 营养性萌发剂首先穿过孢子外层(可能是特殊的微孔, 被 GerP 蛋白促进) 与内膜的受体蛋白如 GerA、GerB、GerK 等相互作用。这种相互作用可能包括附近离子的转移, 刺激相关膜的

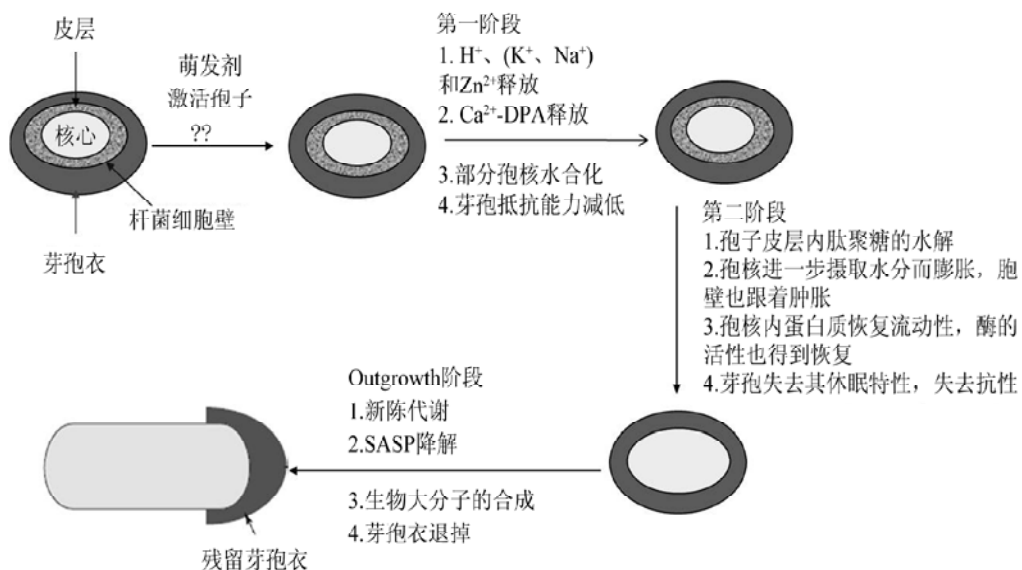


图1 芽孢萌发过程示意图<sup>[9]</sup>

变化和大批离子的运动。水进入芽孢核内,一个未知信号被传输到孢子外层,激活胞溶解酶(CWLJ和SLeB)来水解皮层的肽聚糖;皮层水解逐渐补充孢子核内的水分,芽孢恢复酶活力,启动大分子合成的系列代谢活动,孢子生长成一个营养细胞。

最早解释萌发过程信号转导以及相关变化的一个假说是认为在孢子萌发的早期,膜通透性发生变化,导致孢子内离子和水的重新分配。因此,激活皮层溶解酶的活性从而水解皮层的肽聚糖,导致孢子萌发,当用离子通道阻滞剂处理孢子,孢子萌发受到抑制<sup>[11]</sup>,说明孢子萌发过程涉及膜透性变化及离子的移动,并且可能是与位于孢子膜上*gerA*基因所编码的产物相关<sup>[12]</sup>。孢子去掉芽孢衣后对溶解酶是可通透的,因此用溶菌酶消化皮层,孢子就会萌发<sup>[13]</sup>。所以,皮层溶菌酶被激活是触发萌发的最早步骤<sup>[14]</sup>。在皮层肽聚糖水解之前,自由氨基酸、Ca<sup>2+</sup>-DPA和其他小分子物质会从孢子内释放出来,但腺嘌呤核苷3-磷酸不会被释放,这些结果表明,在萌发早期,孢子内膜对一些物质渗透性改变是有选择性的<sup>[15]</sup>。

然而,最近几年的许多独立的实验证据证明孢子萌发的早期事件包括耐热性的缺失、离子的运动和部分的核内再水合,并不是完全依赖皮层肽聚糖的水解。在*cwlD*突变体中,孢子肽聚糖缺少正常的胞壁酸 $\delta$ -内酰胺,皮层溶解酶不能识别皮层的肽聚糖而将其降解,尽管孢子皮层不被水解,孢子还是能完成孢子萌发的早期事件,即失去耐热性、离子释放和部分的核内再水合<sup>[13]</sup>。当然,皮层的降解对于孢子完全萌发及其后续整个原生质体从原结构包裹中释放出来是很重要的。像*sleB*和*cwlJ*的双突变体不能把皮层水解到一定的程度,孢子在完成其早期萌发事件即失去耐热性和释放完DPA后,孢子后续的萌发会被抑制<sup>[16]</sup>,说明没有降解皮层可以阻碍孢子后续萌发的完成。目前,枯草芽孢杆菌的皮层溶菌酶SleB和CwlJ已经被鉴定<sup>[17]</sup>。

## 2 芽孢营养性萌发剂与特殊受体的相互作用

营养性萌发剂在与其受体作用之前,首先要渗透穿过孢子衣(spore coat)和皮层。孢子衣可以影响萌发剂的通透性,蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)*gerP*突变体如果不去除孢衣,其孢子萌发很慢,孢子萌发后菌落形成能力降低了20%,表明*gerP*编码的蛋白在孢子衣的形成方面起重要作用<sup>[18]</sup>。

营养性萌发剂是通过与位于孢子内膜的受体结

合而起作用的。最早对枯草杆菌中两个条件性萌发突变体模型研究发现<sup>[19]</sup>,孢子能正常的响应某种营养性萌发剂,但对另外一种没有响应,这表明只有特异性萌发剂才能与受体连接,其中某种关键性的受体分子在信号转导中起作用。*gerA*和*gerB*操纵子是第一个被克隆和描述的萌发剂受体操纵子<sup>[20,21]</sup>,所有能形成孢子的细菌的基因组中至少包含其中的一个操纵子,但在通常的情况下细菌的基因组有多个受体操纵子,所以这些能形成孢子的细菌往往通过多种受体响应不同类型的萌发剂,有时候不只是一个受体应对单个或多种萌发剂<sup>[22-24]</sup>。实际上编码这些受体的基因簇与原来共同祖先的基因差异越来越大。

枯草芽孢杆菌中*gerA*是产芽孢细菌类相关操纵子大家族中第一个被描述的操纵子,其三个同源基因编码孢子膜上三个相关的蛋白:GerAA、GerAB和GerAC(图2)。GerAA蛋白不仅参与疏水结构域还参与亲水结构域的组成,有五或六个跨膜结构域和一个N末端亲水结构域;GerAB蛋白类似于膜整合蛋白有十个横跨膜螺旋;GerAC是亲水性基因产物。其中GerAA、GerAB可能是单组分amino acid/polyamine/organocation (APC)转运超家族的膜整合蛋白,GerAC可能是含有前脂蛋白信号序列的脂蛋白<sup>[20,25,26]</sup>。由*gerA*操纵子编码的这三个蛋白在芽孢中相互作用并且形成一个受体复合物,任何一个组分的失活都会影响整个受体的功能。GerA是L-丙氨酸的受体,*gerB*和*gerK*编码的GerB和GerK是AGFK和葡萄糖的受体。*gerA*的转录起始于细菌开始形成芽孢后 $2.5 \sim 3$  h<sup>[27]</sup>。蜡状芽孢杆菌ATCC 14579的基因组包含七个可能的*ger*操纵子,它们分别为*gerG*、*gerK*、*gerI*、*gerL*、*gerS*、*gerQ*和*gerR*<sup>[25]</sup>,其中*gerL*编码的GerL受体参与L-丙氨酸诱导的萌发;*gerQ*编码的GerQ受体参与肌苷诱导的萌发,而*gerI*和*gerR*编码的GerI、GerR受体既参与L-丙氨酸诱导的萌发也参与肌苷诱导的萌发<sup>[25]</sup>。

## 3 芽孢萌发过程中的离子通道

在芽孢萌发早期,孢子膜透过性增加<sup>[28,29]</sup>,首先是孢子核的阳离子包括H<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>等释放到孢子外面,紧接着是Ca<sup>2+</sup>等二价阳离子和DPA的释放,随后K<sup>+</sup>依赖能量再次被吸收。这表明当萌发剂与受体结合后,一个或多个孢子内膜上的离子通道被打开。目前,我们对离子转运或代谢性离子的通道知之甚少。Ca<sup>2+</sup>-DPA是孢子的重要组成部分,占

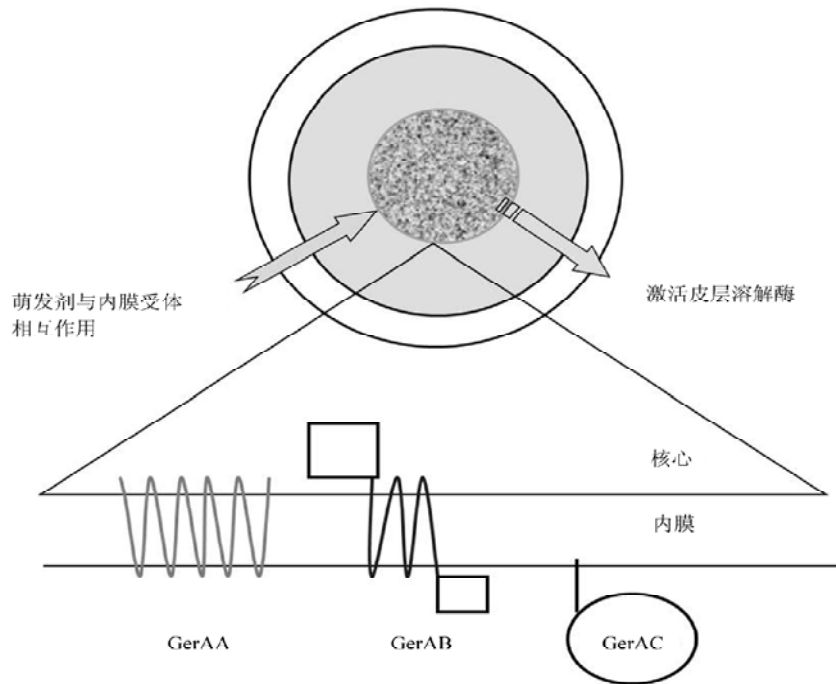


图2 枯草芽孢杆菌孢子营养性萌发剂受体在内膜定位<sup>[26]</sup>

整个孢子干重的5%~10%<sup>[30]</sup>;在孢子形成期间,肯定存在一种机制使得DPA从母细胞合成部位被摄入进前芽孢内,这种高浓度DPA的积累显然是需要能量的。但是没有证据证明在芽孢萌发过程中DPA和阳离子的释放需要能量。

应用单细胞光镊拉曼光谱技术研究单个芽孢萌发过程发现<sup>[31, 32]</sup>,不管是用营养性萌发剂或是用非营养性萌发剂处理芽孢,芽孢DPA的释放明显分两个阶段:第一阶段是一个缓慢的过程,持续时间从几分钟到一个多小时不等,大部分需要30~40 min,释放的DPA不超过总量的30%;第二阶段是一个快速的过程,一般3 min内就可以将余下的大约70%的DPA释放完毕,表明在这个阶段所有DPA通道是瞬间打开的。最近的研究发现,*spoVA*编码的SpoVA蛋白在孢子形成时与DPA摄取有关<sup>[33]</sup>,似乎涉及到孢子萌发过程中营养剂与受体的结合引起的DPA的释放<sup>[34]</sup>,可能是营养萌发受体和SpoVA蛋白相互作用,推测是孢子萌发的一个信号转导途径。但是否与孢子萌发过程中DPA和阳离子释放完全有关还没有完全清楚。

一种在蜡样芽孢杆菌中称之为GerN的 $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ 反向蛋白已经被鉴定,涉及到蜡样芽孢杆菌次黄嘌呤核苷触发的萌发<sup>[35, 36]</sup>;蜡样芽孢杆菌*gerN*突变体的生长以及孢子的形成没有受到影响,但在次黄

嘌呤核苷诱导萌发过程中孢子的萌发能力显著降低,在丙氨酸中其萌发能力次之,在 $\text{Ca}^{2+}$ -DPA中其萌发能力完全没有受到影响,这种萌发剂缺陷型的特异性表明,GerN起到连接受体的作用,而不是一般的离子转运功能。*gerN*基因是巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)*grmA*基因的同源基因,巨大芽孢杆菌*grmA*突变体在营养性萌发剂里不能萌发,说明*grmA*编码的GrmA蛋白对所有营养性萌发剂响应是必需的;枯草芽孢杆菌没有GerN相近的同族体,它的受体是类似于蜡样芽孢杆菌中的丙氨酸受体,枯草芽孢杆菌同族体的突变体似乎对孢子的萌发没有影响<sup>[36]</sup>。Southworth等<sup>[35]</sup>推测,如果萌发剂受体在信号转导过程移动离子,则有助于恢复离子或改变局部的电荷平衡;次黄嘌呤核苷对离子异常敏感,被 $\text{K}^+$ 抑制,一般能刺激其他菌种孢子的萌发。蜡样芽孢杆菌的次黄嘌呤核苷受体蛋白GerIA在N端有很长的富含谷氨酰胺连接区域,它可能增强与其他组分相互作用的潜在性<sup>[37]</sup>。

产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)的基因*gerO*和*gerQ*编码两种蛋白GerO和GerQ,它们对单价阳离子的转运功能表明,它们在某些杆菌孢子萌发中起作用<sup>[38]</sup>。GerO和GerQ在大肠杆菌中能转运单价阳离子( $\text{K}^+$ 和/或 $\text{Na}^+$ ),GerO和GerQ仅在产气荚膜梭状芽孢杆菌孢子形成的母细胞中表

达。缺少GerO,产气荚膜梭状芽孢杆菌即使在富含KCl、L-天门冬酰胺和Ca<sup>2+</sup>-DPA的培养基上培养,孢子萌发也会受到影响,这种影响是在Ca<sup>2+</sup>-DPA释放之前。野生型*gerO*的异源表达能补充*gerO*孢子的所有缺陷;相对GerO的缺失, GerQ的缺少对孢子萌发的影响小很多。

#### 4 芽孢萌发过程中皮层溶解酶的作用

孢子核心外包裹一层薄薄的、营养细胞类型的肽聚糖,这层相当于细菌的细胞壁,往外由更厚一层皮层包裹,皮层含有芽孢特有的肽聚糖<sup>[17]</sup>,皮层外是芽孢衣,经化学处理后有通透性,溶解酶可以通过它进入皮层并水解皮层。一些孢子萌发模型研究表明<sup>[39]</sup>,孢子萌发过程中热抗性的丧失是激活皮层溶解酶的一个直接结果。

枯草芽孢杆菌孢子萌发中的两个关键皮层溶解酶是CwlJ和SleB。*cw1D*突变体的菌株孢子缺少SleB和CwlJ,除非皮层被外源溶解酶水解,否则孢子在琼脂培养基上不能生长或形成菌落<sup>[40,41]</sup>。CwlJ是芽孢形成过程中在母细胞中合成的,位于芽孢的外层;而SleB则在前芽孢中合成,位于芽孢内膜和外层<sup>[41,42]</sup>。在休眠芽孢里,CwlJ和SleB都需要另外的蛋白质给其定位,CwlJ的定位需要外衣蛋白YwdL(GerQ),SleB需要跨膜蛋白YpeB<sup>[40]</sup>。枯草芽孢杆菌的SleB蛋白是转糖基型溶菌酶,我们不知道芽孢萌发过程中信号如何传导给它以及它是如何被激活的,有人认为是营养性萌发剂和受体蛋白结合或胁迫皮层肽聚糖而活化它的<sup>[43]</sup>;在芽孢内,SleB的活性与抗热性有关。同样,我们不知道CwlJ确切的功能,但知道它可以被外源Ca<sup>2+</sup>-DPA所诱导。在正常的芽孢萌发过程中,CwlJ极有可能也被从芽孢核内释放的Ca<sup>2+</sup>-DPA所激活。由于CwlJ和SleB是在芽孢形成前合成的,一定有一种机理使它们在休眠芽孢里保持不活泼状态<sup>[44-46]</sup>,目前这种机制不清楚。

在有其他因子激活孢子萌发受体的情况下,CwlJ或SleB的缺少不会阻碍孢子萌发的完成,但CwlJ的缺少会减慢DPA释放。在KBr刺激的萌发中,两种皮层溶解酶的缺少也不会阻碍DPA和谷氨酸盐的释放,但孢子生存能力降低,不能完成萌发。CwlJ和SleB的缺少不影响十二烷基刺激孢子萌发中DPA的释放。巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌孢子萌发中皮层溶解酶的作用相似,所以,CwlJ和SleB在巨大芽孢杆菌孢子萌发皮层降解中也起着非

常重要的作用<sup>[47]</sup>。

#### 5 芽孢的非营养性萌发及其途径

除了上述提到营养性萌发剂以外,芽孢也会被其他非营养性化学试剂或物理因素激发而萌发,包括溶解酶、盐类、压力、Ca<sup>2+</sup>-DPA和癸胺类阳离子表面活性剂,说明这些非营养性物质可以迂回绕过营养性萌发途径的受体触发芽孢的萌发<sup>[9]</sup>。

图3是营养性和非营养性枯草杆菌芽孢萌发模型图。如图所示,芽孢被营养性或非营养性化学试剂或物理因素激发而产生的萌发是有多条途径的。(1)营养性萌发剂和受体结合,诱使孢子核内离子以及Ca<sup>2+</sup>-DPA的释放,Ca<sup>2+</sup>-DPA随后激活CwlJ,或部分孢子内核的水合化和皮层的降解激活SleB,水解皮层的肽聚糖,随后是孢子内核的水合化,最后完成孢子的萌发。SleB作用要么是萌发受体与营养剂结合的激活触发,要么是萌发第一阶段孢子内核水解导致的孢子皮层压力的改变。也许营养性萌发剂与萌发受体的结合激活了孢子内膜的SleB,而皮层压力激活了内膜的SleB,也激活了部分位于芽孢衣上的SleB。然后SleB和(或)CwlJ催化皮层水解,它是萌发第II阶段细胞壁扩张所必需的。(2)除了营养性萌发剂外,非营养性外源Ca<sup>2+</sup>-DPA也是一种优良的芽孢萌发剂,缺乏营养性受体蛋白的芽孢在外源Ca<sup>2+</sup>-DPA的作用下可以正常萌发。CwlJ酶被外源Ca<sup>2+</sup>-DPA激活后,水解位于芽孢皮层的肽聚糖,引起内源Ca<sup>2+</sup>-DPA的释放,最终导致芽孢的萌发。外源Ca<sup>2+</sup>-DPA激活CwlJ,然后导致皮层水解,这个过程随着内源Ca<sup>2+</sup>-DPA的释放会被放大。(3)许多品种的芽孢能够在100~600 MPa的高压下萌发。用100~200 MPa低压处理,芽孢的受体蛋白被活化而萌发;用500~600 MPa的高压处理,可以部分打开Ca<sup>2+</sup>-DPA通道,最终导致孢子的萌发<sup>[48]</sup>,但其机理不详。枯草芽孢杆菌中压力刺激的萌发导致许多小分子包括DPA的释放。SpoVA涉及DPA释放可能是因为SpoVA是孢子内膜DPA通道的组分<sup>[49]</sup>。(4)烷基胺诱导Ca<sup>2+</sup>-DPA的释放直接或间接被孢子内膜影响,但对于盐类和表面活性剂如何诱导芽孢萌发的过程和机理,目前人们对此知之甚少。(5)溶菌酶处理也会导致皮层水解,而这反过来在某种程度上又导致Ca<sup>2+</sup>-DPA的释放。

#### 6 展望

在过去十年里我们对孢子萌发的认识显著提

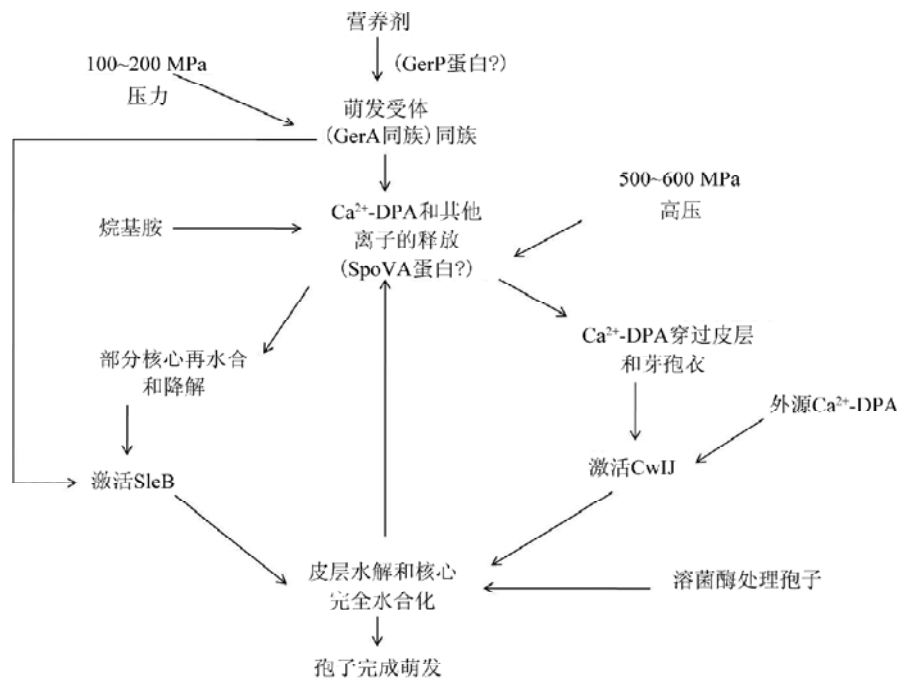


图3 枯草杆菌芽孢营养性和非营养性萌发途径模型图<sup>[9]</sup>

高, 几乎所有孢子前体的基因组都被测序, 包括萌发受体操纵子的多拷贝和双重拷贝, 我们对皮层溶解酶也有了更多的认识, 但我们还不知道位于膜脂环境中的萌发剂受体蛋白的详细功能<sup>[28]</sup>, 也不知道位于内膜和外层的SleB皮层溶解酶是如何被激活的以及SleB和CwlJ是如何作用于皮层的。虽然我们已知在萌发过程中芽孢衣部分降解, 但我们全然不知芽孢衣在萌发中是怎样降解的, 这可能是今后孢子萌发研究中的一个焦点。在不久的将来, 梭状芽孢杆菌和其他杆菌的基因组研究的进展将有助于在分子水平上对孢子萌芽机制的了解。

[参 考 文 献]

[1] Setlow P. Resistance of bacterial spores [M]// Storz G, Hengge-Aronis R. Bacterial stress responses. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2000: 217-30

[2] Paidhungat M, Setlow P. Spore germination and outgrowth [M]// Hoch JA, Losick R, Sonenshein AL. *Bacillus subtilis* and its relatives: from genes to cells. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002: 537-48

[3] Gould GW. Germination [M]// Gould GW, Hurst A. The Bacterial spore. New York: Academic Press, 1969: 397-444

[4] Setlow P. Dormant spores receive an unexpected wake-up call. *Cell*, 2008, 135(3): 410-2

[5] Jedrzejewski MJ, Setlow P. Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism

of catalysis by a phosphoserine intermediate. *Chem Rev*, 2001, 101(3): 607-18

[6] Setlow B, Melly E, Setlow P. Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage of spore germination. *J Bacteriol*, 2001, 183(16): 4894-9

[7] Cowan AE, Koppel DE, Setlow B, et al. A cytoplasmic protein is immobile in the cytoplasm of dormant spores of *Bacillus subtilis*: implications for spore dormancy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 4209-14

[8] Moir A. How do spores germinate? *J Appl Microbiol*, 2006, 101(3): 526-30

[9] Setlow P. Spore germination. *Cur Opin Microbiol*, 2003, 6(6): 550-6

[10] 吴艳艳, 孙长坡, 高继国, 等. 苏云金芽孢杆菌HD-73菌株芽孢萌发条件的优化及质粒pHT73对芽孢萌发的影响. *中国农业科技导报*, 2007, 9(3): 98-103

[11] Keynan A. Spore structure and its relations to resistance, dormancy, germination [M]// Chambliss G, Vary JC. Spores VII. Washington DC: American Society for Microbiology, 1978: 43-53

[12] Moir A, Smith DA. The genetics of bacterial spore germination. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 531-53

[13] Popham DL, Helin J, Costello CE, et al. Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(26): 15405-10

[14] Foster SJ, Johnstone K. Pulling the trigger; the mechanism of bacterial spore germination. *Mol Microbiol*, 1990, 4(1): 137-41

[15] Setlow B, Wahome PG, Setlow P. Release of small molecules during germination of spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol*, 2008, 190(13): 4759-63

- [16] Ishikawa S, Yamane K, Sekiguchi J. Regulation and characterization of a newly deduced cell wall hydrolase gene (*cwLJ*) which affects germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 1998, 180 (6): 1375-80
- [17] Atrih A, Foster SJ. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Leeuwenhoek*, 1999, 75 (4): 299-307
- [18] Behravan J, Chirakkal H, Masson A, et al. Mutations in the *gerP* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *J Bacteriol*, 2000, 182 (7): 1987-94
- [19] Moir A, Lafferty E, Smith DA. Genetic analysis of spore germination mutants of *Bacillus subtilis* 168—correlation of phenotype with map location. *J Gen Microbiol*, 1979, 111 (1): 165-80
- [20] Zuberi AR, Moir A, Feavers IM. The nucleotide sequence and gene organization of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. *Gene*, 1987, 51 (1): 1-11
- [21] Corfe BM, Sammons RL, Smith DA, et al. The *GerB* region of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome encodes a homolog of the *gerA* spore germination operon. *Microbiology: UK*, 1994, 140: 471-8
- [22] Barlass PJ, Houston CW, Clements MO, et al. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of *gerI* and *gerQ* operons. *Microbiology*, 2002, 148 (Pt7): 2089-95
- [23] Ireland JAW, Hanna PC. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Delta Sterne endospores: *gerS* mediates responses to aromatic ring structures. *J Bacteriol*, 2002, 184 (5): 1296-303
- [24] McCann KP, Robinson C, Sammons RL, et al. Alanine germination receptors of *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 23 (5): 290-4
- [25] 梁亮, 盖玉玲, 胡坤, 等. 苏云金芽孢杆菌 *gerA* 操纵子在芽孢萌发中的作用. *微生物学报*, 2008, 48 (3): 281-6
- [26] Moir A, Corfe BM, Behravan J. Spore germination. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59 (3): 403-9
- [27] Feavers IM, Foulkes J, Setlow B, et al. The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1990, 4 (2): 275-82
- [28] Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, et al. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (20): 7733-38
- [29] Stewart G, Eaton MW, Johnstone K, et al. An investigation of membrane fluidity changes during sporulation and germination of *Bacillus megaterium* Km measured by electron-spin and nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 600 (2): 270-90
- [30] Paidhungat M, Setlow B, Driks A, et al. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J Bacteriol*, 2000, 182 (19): 5505-12
- [31] Chen D, Huang SS, Li YQ. Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single *Bacillus* spores by laser tweezers Raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2006, 78 (19): 6936-41
- [32] Huang SS, Chen D, Pelczar PL, et al. Levels of Ca-DPA in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers. *Bacteriology*, 2007, 189 (13): 4681-7
- [33] Vepachedu VR, Setlow P. Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive spo mutations in the *spoVA* operon. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 239 (1): 71-7
- [34] Vepachedu VR, Setlow P. Analysis of interactions between nutrient germinant receptors and SpoVA proteins of *Bacillus subtilis* spores. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 274 (1): 42-7
- [35] Southworth TW, Guffanti AA, Moir A, et al. GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> antiporter. *J Bacteriol*, 2001, 183 (20): 5896-903
- [36] Thackray PD, Behravan J, Southworth TW, et al. GerN, an antiporter homologue important in germination of *Bacillus cereus* endospores. *J Bacteriol*, 2001, 183 (2): 476-82
- [37] Clements MO, Moir A. Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J Bacteriol*, 1998, 180 (4): 6729-35
- [38] Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR. GerO, a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> antiporter, is essential for normal germination of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 2009, 191 (12): 3822-31
- [39] Johnstone K. The trigger mechanism of spore germination current concepts. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 1994, 23: 17S-24S
- [40] Boland FM, Atrih A, Chirakkal H, et al. Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB. *Microbiology*, 2000, 146 (Pt1): 57-64
- [41] Chirakkal H, O'Rourke M, Atrih A, et al. Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. *Microbiology*, 2002, 148 (Pt 8): 2383-92
- [42] Bagyan I, Setlow P. Localization of the cortex lytic enzyme CwlJ in spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2002, 184 (4): 1219-24
- [43] Tovar-Rojo F, Chander M, Setlow B, et al. The products of the *spoVA* operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2002, 184 (2): 584-7
- [44] Foster SJ, Johnstone K. Purification and properties of a germination-specific cortex-lytic enzyme from spores of *Bacillus megaterium* KM. *Biochem J*, 1987, 242 (2): 573-9
- [45] Makino S, Ito N, Inoue T, et al. A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination. *Microbiology*, 1994, 140 (Pt6): 1403-10
- [46] Paidhungat M, Ragkousi K, Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca<sup>2+</sup>-dipicolinate. *J Bacteriol*, 2001, 183: 4886-93
- [47] Setlow B, Peng L, Loshon CA, et al. Characterization of the germination of *Bacillus megaterium* spores lacking enzymes that degrade the spore cortex. *J Appl Microbiol*, 2009, 107 (1): 318-28
- [48] Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, et al. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (6): 3172-5

- [49] Vepachedu VR, Hirneisen K, Hoover DG, et al. Studies of the release of small molecules during pressure germination of spores of *Bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol, 2007, 45 (3) : 342-8