

利用高效检测菌株对中慢生根瘤菌 及红壤中自体诱导物的检测^①

钟增涛¹ 周 晶¹ 李 路² 高轶静¹ 朱 军^{1*}

(1 南京农业大学农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095;

2 南京师范大学生命科学学院生物技术系 南京 210097)

摘 要 利用高效的自体诱导物(AI)检测菌株 KYC55 检测中慢生根瘤菌属不同种菌株产生的 AI, 发现 AI 在中慢生型根瘤菌中广泛存在, AI 在酸性条件下比较稳定。选用酸性土壤(红壤)作为材料, 乙酸乙酯抽提并检测其 AI, 发现生境条件、采样时间及保存条件都对 AI 的稳定性有影响。

关键词 群体感应; 中慢生根瘤菌; 红壤; 自体诱导物

中图分类号 S154; S154.38[†]

大约在 25 年前, 人们在发光的海洋细菌中发现了群体感应现象。群体感应是细菌根据细胞密度的变化进行基因调控的一种生理行为, 具有群体感应的细菌产生一种被称作为自体诱导物的信号分子, 它随着细胞密度的增加而同步增加, 当这种信号分子积累达到一定的浓度就会改变细菌特定基因的表达^[1]。许多细菌通过群体感应与周围的环境进行信息交流, 从而改变多种细菌的生理特性。

土壤微生物与植物的根系形成一个稳定的动态系统, 在这个系统中, 它们之间相互作用, 相互影响^[2]。在许多陆生细菌的群体感应中, *N*-acyl-homoserine lactone (acyl-HSLs, 酰基高丝氨酸内酯) 必须达到 1 μmol 浓度时才能引起群体反应。然而在自然条件下, acyl-HSLs 在环境中不断地被化学和生物的方法分解, 因此很难达到上述浓度^[3], 即使是偶尔在较短的时间里能接近该浓度。细菌的聚集、生物膜的形成等能在局部大量提高 acyl-HSLs 的浓度, 相反高 pH、酶的降解作用则会有效降低信号分子的浓度, 影响调控蛋白的活性^[4], 因此在一般土壤条件下细菌的群体感应并不发挥作用, 但在特定的土壤酸碱条件及特定的土壤区域(根系)中, 土壤细菌的自体诱导物(autoinducers, AI)会发生积累, 达到引发浓度从而发挥其生物学效应。研究发现, 根际中存在的 AHLs 产生细菌所占的比例远远大于一般土壤环境, 其主要是通过调控胞外多糖的合成、

吸附和生物膜的形成来发挥作用^[5], 表明群体感应在根际细菌定殖、竞争中发挥着重要作用^[6]。由此可见, 在根际环境中, 由于细菌能产生聚集或形成生物膜, 使得信号分子发生积聚, 从而产生信号传递, 发挥其生物学效应, 影响整个根际生态环境。因此对根际细菌群体感应的研究在了解根际微生物生态学、微生物种群变化及由此造成的菌植互作的变化上意义十分重大。

在与植物互作的细菌中, 群体感应被用来调控许多重要的生理性状, 可是目前只在少数种类的该类细菌中发现受群体感应调控的性状, 因为在自然条件下这类细菌不是单独存在的, 它们必须和环境复杂的微生物群落竞争才能得以在植物体定殖, 因而在纯培养条件下这些性状是不易被发现的。土壤和根际微生物的竞争和生存受到群体感应所调节生理性状的影响, 而相互竞争的结构会造成细菌种群的变迁。研究表明在共同生长的微生物群落间的信号交流会影响生防 *P. aureofaciens* strain 30-84 的基因表达, 因此一种细菌产生信号分子会对整个根际生态环境造成巨大的影响, 改变其生物构成和根际土壤的生物活性^[7]。对群体感应的研究已经有十几年的时间, 对其信号分子的结构和功能的认识也越来越深入, 还将有许多的 AI 会被发现, 而对与植物相互作用的细菌受群体感应调控的性状及其在菌植互作作用的研究将成为该领域的热点问题。群体

^①国家杰出青年基金(30325004), 霍英东基金(91023)和自然科学基金项目(30200036)资助。

*通讯作者(jun_zhu@njau.edu.cn)

感应在与植物相互作用细菌中调控的与其生存、竞争相关性状的研究将在根际微生物生态及应用生物技术方面引起广泛的关注^[8]，人们对共生微生物群落间信号交流的研究也将产生浓厚的兴趣。

本实验应用 KYC55 高效检测菌株对不同生境土壤中的 AI 进行了检测，建立了一套有效、可行的从土壤中检测 AI 的方法，同时也为研究植物如何影响根际微生物间的信号传递提供了有效的研究手段。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

红壤草地土，红壤灌木土，红壤茶园土（均采自于中国科学院江西红壤生态试验站）。

检测菌株：KYC55(pJZ372) [Tc^R] (pJZ384) [Sp^R] (pJZ410) [Gm^R]，本实验室保存^[9]。

1.2 实验方法

1.2.1 C18 反相薄层层析 对 Mh93 上清液的乙酸乙酯萃取液和标准 AHL 分子分别进行稀释，在 C18 反相薄层层析板上加入 1 μ l 样品，风干后以乙酸乙酯为流动相进行层析，层析后经风干在薄板上铺上一层含有 X-gal 和生物检测菌株 (KYC55) 的 AT 琼脂培养基，观察薄板的颜色变化。

1.2.2 土壤中 AI 的抽提 100g 土壤浸入 100ml 乙酸乙酯，充分振荡，静置过夜，收集的乙酸乙酯一起用旋转蒸发器蒸发至剩余 2ml 左右，在真空干燥器中蒸干，用 1ml 水溶解，-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.3 土壤中 AI 的检测 ①吸取 AT 培养基，接种 KYC55，摇匀，分装 1.5ml 到灭过菌的小试管，加入 150 μ l 的上清液，摇匀，28 $^{\circ}$ C 培养过夜。②在 2ml 的小试管中依次加入 0.8ml 的 Z-buffer，200 μ l 的待检菌液，2 滴 0.005 g/L 的 SDS，3 滴氯仿；剧烈振荡，加 ONPG 100 μ l，摇匀，开始计时，变黄后加入 600 μ l NaCO₃ 终止反应，记变色时间，离心后测定其 OD₄₂₀，同时测定菌液的 OD₆₀₀。③根据变色时间、OD₄₂₀ 和 OD₆₀₀ 计算 AI 活性。

2 结果与分析

2.1 中慢生根瘤菌属不同种 AI 的检测结果

由图 1 可见，AI 在中慢生根瘤菌中广泛存在，在同一个属中其种类存在差异，同时 AI 的表达量也有差异。在实验中利用构建的高效 AI 检测菌株能很好地检测与植物共生的中慢生根瘤菌属中不同种的

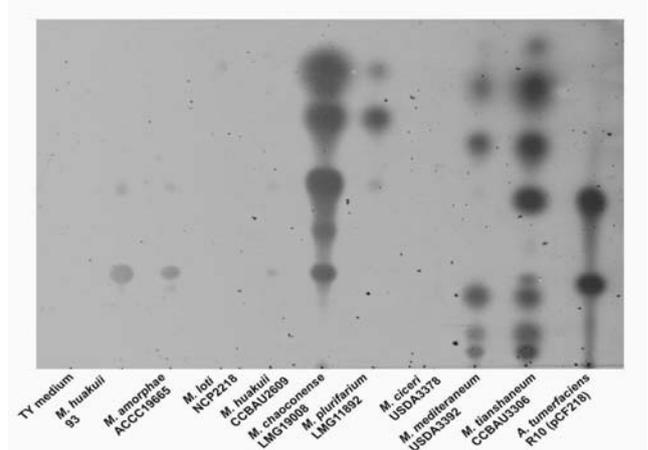


图 1 中慢生根瘤菌的 AI 产生情况

Fig. 1 Autoinducers in Mesorhizobium

AI 存在。研究表明 AI 在根瘤菌与植物间的相互作用中发挥着重要的作用^[10]，本实验对中慢生根瘤菌 AI 的检测为今后开展根瘤菌与植物间相互作用的研究打下了基础。

2.2 pH 对 AI 稳定性的影响

本实验室的研究结果发现，pH 对于 AI 的稳定性影响很大，AI 可以随着 pH 的升高而发生碱水解。为进一步研究 pH 对其稳定性的影响，以便考察不同环境条件对 AI 的影响，为今后开展自然环境条件下 AI 的检测及研究工作，我们通过培养基中加入 MOPS 缓冲溶液对其稳定性进行了研究（图 2）。由图 2 可以看出，加入 MOPS 的培养基由于 pH 稳定在中性范围内，其 AI 的活性下降趋势减缓。可见环境 pH 的升高会导致 AI 稳定性的降低，因此在一定土壤 pH 条件下（酸性），AI 的稳定性会得到提高，

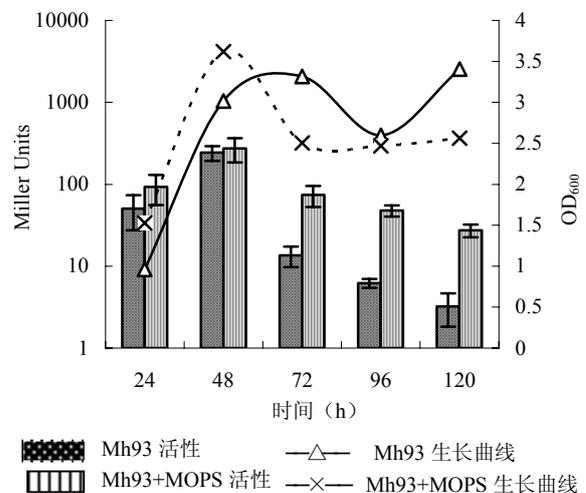


图 2 pH 对 AI 活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on AI activity

从而在环境中产生累积, 影响土壤生物活性。

2.3 不同生境红壤中 AI 的检测

结合 pH 对 AI 稳定性影响的结果, 选择酸性的红壤作为供试材料进行土壤环境 AI 检测 (图 3)。从图 3 可以看出, 在红壤中能检出一定数量的 AI。目前尚未有报道在土壤条件下检测到 AI 的存在, 因此该结果对于开展土壤微生物信息交流的研究具有重要意义。但是在实验中发现不同的生态环境中 AI 的数量存在差异, 其中草地条件下的土壤中 AI 的含量最多, 而其他两种土壤中基本不能检出 AI。通过测定 3 种生境红壤的 pH 发现, 茶园土, 灌木土, 草地土的 pH 分别为 4.57, 4.32, 4.71, 均为酸性条件。虽然同样是红壤, 同样是酸性条件, 但是结果差异较大。导致 AI 数量差异的因素很多, 如相应植被的根际条件, 环境中的水解酶含量等都会造成 AI 浓度的变化, 同时植物的组织脱落物会对根际土壤微生物产生影响^[11]。研究表明^[12]红壤中不同生态系统下芽孢杆菌属内的物种多样性存在差异, 与植被种类

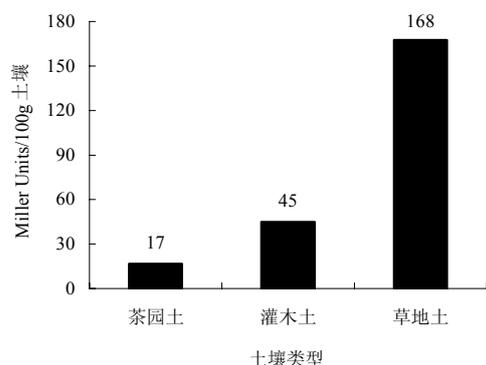


图 3 不同生境红壤中 AI 的检测

Fig. 3 AI in soils different in condition

有一定的相关性, 同时非生物因素也会对土壤中微生物的群体结构产生影响^[13]。由于我们所采样的土壤均是根际土壤, 不同植被根际的复杂条件以及不同土壤条件下微生物活性的不同导致了其中 AI 含量的差异。

2.4 不同保存条件下红壤中 AI 的检测

从图 4 可以看出, 不同条件下, AI 的保存效果存在差异, 其中常温条件下抽提的 AI 的活性最好。我们猜测其原因是常温条件下产生 AI 的微生物继续生长, 继续产生 AI, AI 的产生速度大于其降解速度, 所以其活性最高。但是微生物在 4℃ 时生长会受到抑制, AI 不能产生, 同时 AI 的降解速度也会降低, 但降解速度更快一点。而 -70℃ 时微生物的生物及化学过程都被抑制, 因此其 AI 的浓度与保存前一致。在图 4 中由于该样品是在 4 月份采集, 而图 3 的样品是在 3 月采集, 两者在采样时温度相差 15℃, 可见随着环境温度的升高, 土壤中微生物的活性提高, 从而导致土壤中 AI 的浓度发生变化。

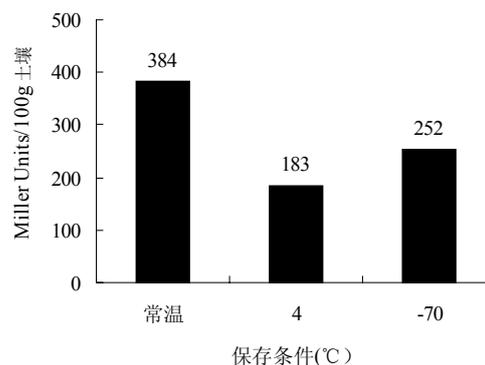


图 4 不同保存条件下草地红壤中 AI 的检测

Fig. 4 Effect of storage condition on AI activity

3 结论

本实验在常规的实验室中 AI 的抽提和检测方法的基础上建立了从土壤中检测 AI 的方法。同时在检测的过程中发现, 不同的生态环境, 不同的采样时间, AI 的数量存在差异。其中草地条件下的土壤中 AI 的含量最多, 这与不同植被的根际条件有关。不同的保存条件, AI 的活性也存在差异, 其中常温条件下抽提的 AI 的活性最好。

参考文献

1 Dunny GM, Winans SC. Cell-cell signaling in bacteria.

Washington, DC: ASM Press, 1999

- 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用. 土壤, 2003, 35 (1): 18 ~ 21
- Flagan S, Ching WK, Leadbetter JR. Arthrobacter strain VAI-A utilizes Acyl-homoserine lactone inactivation products and stimulates quorum signal biodegradation by *Variovorax paradoxus*. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69: 909 ~ 916
- Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends Microbiol., 2002, 10: 365 ~ 370
- Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, Gonzalez JE.

- Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 2003, 185: 325 ~ 331
- 6 Elasmri M, Delormes S, Lemenceau P, Stewart G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 1198 ~ 1209
- 7 Pierson LS III, Wood DW, Pierson EA, Chancey ST. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1998, 36: 207 ~ 225
- 8 Newton JA, Fray RG. Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interact. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(3): 213 ~ 224
- 9 Zhu J, Chai YR, Zhong ZT, Li SP, Winans SC. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-Acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducer in mesorhizobium huakuii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 6949 ~ 6953
- 10 Blosser-Middleton RS, Gray KM. Multiple N-Acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 6771 ~ 6777
- 11 Li ST, Zhou JM, Wang HY, Chen XQ. Phenolic acids in plant-soil-microbe system: A review. *Pedosphere*, 2002, 12(1): 1 ~ 4
- 12 张华勇, 李振高, 王俊华, 潘映华. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性. *土壤*, 2003, 35 (1): 45 ~ 47
- 13 李友国, 周俊初. 两株发光酶基因标记的重组大豆根瘤菌在土壤缩影中的存活研究. *土壤学报*, 2003, 40 (4): 613 ~ 617

DETECTION OF AUTOINDUCER IN *MESORHIZOBIUM* AND RED SOIL

ZHONG Zeng-tao¹ ZHOU Jing¹ LI Lu² GAO Yi-jing¹ ZHU Jun¹

(1 Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

2 Department of Biological Technology, Life Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract Autoinducers from different strains of *Mesorhizobium* were detected with Strain KYC55(pJZ372) (pJZ384) (pJZ410). The results show that autoinducers widely exist in *Mesorhizobium*, and pH of the medium affects activities of the autoinducers seriously. Acidic condition is suitable for stability of the autoinducers. So red soil was chosen for extraction of autoinducers with ethyl acetate. It was found that the autoinducer activities varied with the ecological environments, sampling times and preservation conditions.

Key words Colonial response, Autoinducer, *Mesorhizobium*, Soil