

甲基对硫磷降解菌 DLLBR 在青菜及根际土壤中的定殖研究^①

邱珊莲¹ 崔中利^{1,2} 王英¹ 王兴祥² 李顺鹏^{1*}

(1 南京农业大学农业部环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095;

2 中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘要 将 GFP 基因标记的甲基对硫磷降解菌 DLLBR 接入 100 ml LB 培养基, 过夜培养达到 10^{10} cfu/ml, 浇灌到盆钵试验的 800 g 土壤中, 20 天后用激光共聚焦显微镜检测其在小青菜植株根部和植株内的定殖及分布。结果表明标记菌株能够在植株根圈较好地定殖, 也能在植株内定殖。30 天后将植株各段研磨破碎, 涂布 LB 平板计数发光菌落数, 在根内的定殖数为 10^4 cfu/g 根, 在茎内的定殖数为 10^2 cfu/g 茎。结果还发现与不接菌的对照相比, 处理促进了植株内细菌群落结构的变化, 尤其是芽孢杆菌的种类和数量明显增加。接菌 45 天后通过土壤计数检测发现, 标记菌株在土壤中的存活力很高, 能达到 10^6 cfu/g 土, 同时也发现与对照相比, 接菌的土壤细菌群落结构明显发生了变化, 细菌种类变化不大, 但芽孢杆菌的数量明显增加。

关键词 GFP 基因标记; 激光共聚焦显微镜; 研磨; 植株内细菌群落结构; 土壤细菌群落结构

中图分类号 X172

直接向农药污染的环境中释放外源的农药降解菌是生物修复的一种有效方法。虽然对农药残留降解菌的筛选、应用以及降解机理等的研究已有很多报道, 但对这类菌株在土壤中、植物根际和植物体内的定殖动态、散布规律和对根际微生物多样性的影响的研究还鲜有报道。随着绿色荧光蛋白基因 (GFP) 的发现^[1]、分子生物学方法^[2]和显微技术的发展, 为农药残留降解菌的微生物学研究提供了有效的手段。目前, 国外已用荧光显微镜和共聚焦激光扫描显微镜检测 GFP 标记的细菌的活性和生态行为^[3-7]。国内有用 GFP 标记内生固氮菌^[8, 9]来研究其在水稻根际定殖的报道, 有用 luxAB 基因标记甲基对硫磷降解菌 DLL-1 来研究其在土壤和植物根际定殖的报道^[10-12] 以及 luxAB 标记的重组大豆根瘤菌在土壤缩影中的存活研究^[13], 但是还没有应用 GFP 成功标记甲基对硫磷降解菌的报道。本试验利用 GFP 标记的甲基对硫磷降解菌 DLLBR 对其在土壤、植物根际和植物体内的定殖进行了初步研究, 目的在于为以后研究农药残留降解菌在土壤和植物中的降解过程和降解作用机制做一个前期研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

DLL-1 (*Pseudomonas putida*) 是本实验室从土壤中分离得到的 1 株甲基对硫磷降解菌, 通过转入 GFP 标记载体成为稳定遗传的标记菌株 DLLBR, 它能够在紫外光和蓝光下发出绿色荧光。DLLBR 采用 LB 培养基, 于 30℃ 下培养, GFP 载体带有卡那霉素抗性基因, 其使用浓度为 50 μg/ml。

1.2 土壤接种 DLLBR 方法

将 DLLBR 接种到 100 ml 含浓度为 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 过夜培养至 10^{10} cfu/ml, 离心菌体, 用无菌水重悬, 再离心, 用等体积的无菌水悬浮后均匀浇灌于盆钵中的土壤。

1.3 小青菜的培养与表面灭菌

小青菜的品种为南农矮脚黄 (*Brassica campestris ssp. chinensis* L. var.)。采用盆钵在室温下培养, 每个盆钵植入 2 株。植株的表面消毒: 先放于 700 ml/L 的酒精中 30 s, 后放入 1 g/L 的 HgCl₂ 溶液中 5 min, 再用无菌水洗 3 遍。

1.4 小青菜根际和植株内部的 DLLBR 的检测与验证

1.4.1 共聚焦激光扫描显微镜直接观测法 往盆钵中接菌 20 天后, 随机取出部分植株, 将根部的土壤抖掉, 取须根直接置于德国蔡氏 LSM510 显微镜下, 用 488 nm 光扫描, 以绿色通道或红色和绿色通道同时接收荧光信号。然后将植株的剩余部分表

①中国科学院南京土壤研究所开放室基金项目(2025102)和中国科学院知识创新项目(KZCX3-SW-417)资助。

*通讯作者(lsp@njau.edu.cn)

面消毒，取横剖面观测。

1.4.2 表面消毒后纵剖面平板培养法 植株表面消毒后用灭菌的手术剪和手术刀纵剖开，置于含 LB 培养基的平板中培养，36 h 后检测有无发光菌落的存在。

1.4.3 表面消毒植株捣碎后平板涂抹法 植株表面消毒后分为根、茎、叶 3 部分，分别放于研钵中，加入石英砂，将组织研磨捣碎，体积定容到 10 ml，充分摇匀，取 100 μl 涂抹平板，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h 后检测发光菌落数等。

1.4.4 质粒图谱验证 将上述检测出的发光菌落划线纯化，提取质粒，方法参照文献[14]，与出发菌株质粒相比验证。

1.5 土壤中 DLLBR 的检测

取盆钵中的土壤 10 g 与 90 ml 的无菌水混匀，

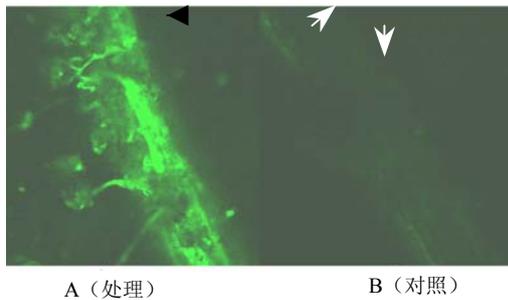
在摇床中振荡 30 min，稀释到 10^{-6} ，将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度取 100 μl 涂抹平板，检测发光菌落数、菌落种类与总菌数。

2 结果与分析

2.1 共聚焦激光扫描显微镜观测定殖动态

施菌 20 天后观察根部的定殖状况如图 1，处理的须根处有明显的绿色荧光，而对照并没有菌团状的绿色荧光，只有较弱的自发荧光。放大 1000 倍时可以直接观察到有大量发光菌聚集在根表面，而对照并没有。

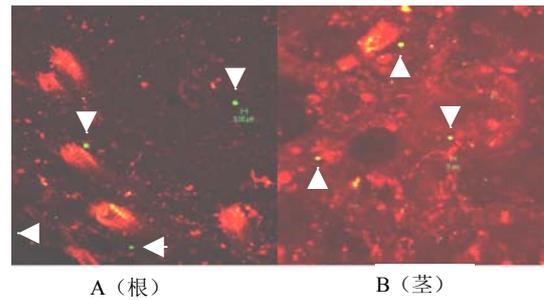
将植株的根部和茎部分别横切，取多个横切面，放大 400 倍再观察，发现处理维管束细胞间有发光菌落的定殖(图 2)，而对照没有(结果未显示)。在叶柄和叶中未检测到 DLLBR。



A (处理) B (对照)

图 1 植株根表面的激光共聚焦扫描图片

Fig. 1 Plant root surface under the confocal laser scanning



A (根) B (茎)

图 2 植株根和茎横切面的激光共聚焦扫描图片

Fig. 2 Transverse section of a plant root and stem under the confocal laser scanning

2.2 植株纵剖面平板检测

植株分段用 750 ml/L 的酒精和 1 g/L 的 HgCl_2 溶液先后消毒，置于 LB 平板培养 36 h，结果如图 3 所示。处理平板上长出了绿色菌落，而对照没有。放于紫外光下，处理有发光菌落，而对照没有；而且可以看到，处理所长菌落(除试验菌)的种类和数量明显比对照多。

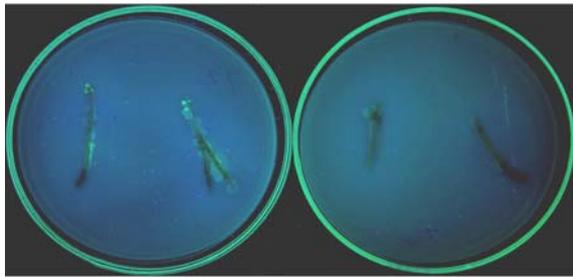
2.3 植株研磨捣碎涂布平板检测

植株各段研磨涂布于平板进行检测(表 1)，发现植株内根段聚集的 DLLBR 最多，其次是茎，在叶柄和叶中未检测到，这与共聚焦激光扫描显微镜的检测结果一致。通过平板计数(图 4)发现，处理比对照的菌落种类增加，这与纵剖面平板检测结果一致，但总菌数变化不大。这说明 DLLBR 进入植株后引起了植株内细菌群落结构的变化。

表 1 植株内细菌群落结构

Table 1 Bacterial communities in the vegetable

植物组织	发光菌落数 (cfu/g)		总菌落数 (cfu/g)		菌落种类 (个)	
	处理	对照	处理	对照	处理	对照
根	2.45×10^4	0	2.96×10^5	1.16×10^6	8	5
茎	7.03×10^2	0	5.38×10^4	5.32×10^4	11	6
叶柄	0	0	2.32×10^3	1.31×10^3	4	4
叶	0	0	3.04×10^2	2.94×10^2	3	3



A (处理) B (对照)

图 3 植株茎纵剖面平板在紫外灯下的检测

Fig. 3 Vertical section of stem under UV

从上述试验中发现 DLLBR 属于兼性植物内生细菌, 因为此菌不仅能在植株根段和茎段内定殖, 它也能够植物根际、土壤中定殖, 并且 DLLBR 能够成为植物根茎内的优势菌, 在根内它约占到总菌量的 10%, 在茎内占到总菌量的 1%, 但它对植物并不造成危害, 从而表明 DLLBR 是一种有益菌或中性菌。有人指出, 植物体本身可以看作是一个复杂的微生态系统, 在这个系统中, 多种微生物能与植物形成营养和竞争的微宇宙, 不同的细菌占据不同的生态位^[15, 16], 各种不同的细菌之间能建立一种动态的平衡体系。DLLBR 定殖于维管束较为致密

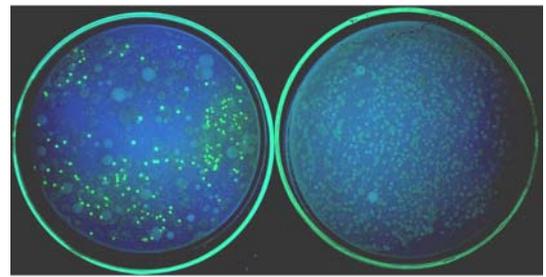


图 5 回收菌株菌落的降解活力

Fig. 5 Degrading ability of recovered strain

2.5 土壤中 DLLBR 的检测

计数结果表明, 施入 DLL-1 菌引起土壤细菌群落结构的变化, 细菌群落种类变化不大, 但多种细菌的数量发生了变化(表 2), 经革兰氏染色和芽孢染色鉴定及芽孢杆菌的鉴定、计数^[17, 18]表明, 土壤中芽孢杆菌的数量明显增加(图 7)。这可能是由于 DLLBR 在土壤中分解有机物质形成腐殖质和



A (处理) B (对照)

图 4 紫外灯下青菜根内 DLLBR 的检测

Fig. 4 DLLBR in vegetable root under UV

的根茎部位, 而不是在整个植株体内的各种组织间到处扩散, 因为内生菌选择生态位有其原则: 一是不受其他内生细菌的干扰, 二是能满足自己的营养需要^[15]。但是在接种 DLLBR 土壤中生长的植物体内的细菌多样性增加, 这是不是由于 DLLBR 与其他菌能够互相利用, 或者诱导植物产生使其他微生物识别的信号分子还有待于进一步研究。

2.4 回收菌质粒图谱和酶活验证

将上述平板中的发光菌在含有甲基对硫磷农药的平板中划线纯化, 点种, 并提取质粒发现(图 5、6), 回收菌即是出发菌, 并具有很强的水解酶活性。

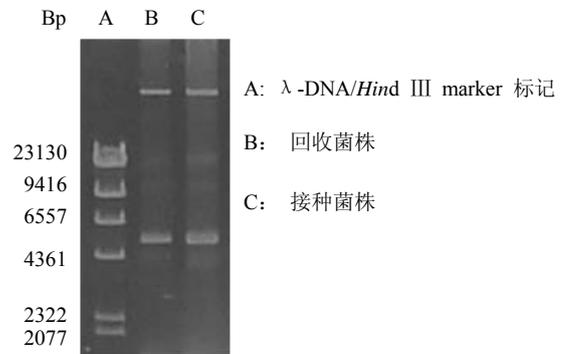


图 6 回收菌株和出发菌株的质粒图谱

Fig. 6 Illustrations of plasmids from recovered strain and inoculating strain

表 2 土壤内细菌群落结构

Table 2 Bacterial communities in soil

	DLLBR (cfu/g)	总菌落数 (cfu/g)	菌落种类 (个)
对照	0	1.75×10^7	12
处理	6.10×10^6	6.56×10^7	13

释放养分^[19], 使能够被微生物尤其是芽孢杆菌利用的土壤有机质增加, 从而增加了微生物的生物量。

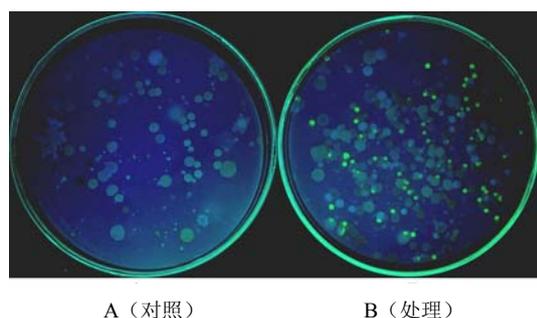


图7 紫外灯下土壤中 DLLBR 的检测
Fig. 7 DLLBR from soil under UV

3 结 论

(1) 甲基对硫磷降解菌 DLLBR 能够在植株根圈很好地定殖, 也能够进入植株内部成为植物根茎内的优势菌。

(2) DLLBR 进入植株后引起了植株内细菌群落结构的变化, 细菌种类增加, 数量变化不大。

(3) 施入 DLL-1 菌引起土壤细菌群落结构的变化, 细菌群落种类变化不大, 但多种细菌的数量发生了变化, 经革兰氏染色和芽孢染色鉴定表明, 土壤中芽孢杆菌的数量明显增加。

参考文献

- Chalife M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802 ~ 805
- 李慧, 陈冠雄, 张颖, 张成刚. 分子生物学方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41(4): 612 ~ 617
- Gage DJ, Bobo T, Long SR. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.*, 1996, 178: 7159 ~ 7166
- Bloemberg GVO, Toole GA, Lugtenberg BJJ, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 4543 ~ 4551
- Normander B, Hendriksen NB, Nybroe O. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas* fluorescence: Localization, viability, and activity in the natural barely rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4646 ~ 4651
- Schlöter M, Borlinghaus R, Bode W, Hartmann A. Direct identification, and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. *J. Microscopy*, 1993, 171: 173 ~ 177
- 姚斌, 徐建民, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. *土壤学报*, 2004, 41 (2): 320 ~ 322
- 安千里, 杨学健, 董越梅, 冯丽洁, 匡柏健, 李久蒂. 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根. *植物学报*, 2001, 43 (6): 558 ~ 564
- 吕泽勋, 李久蒂, 朱至清. 用绿色荧光蛋白基因 (gfp) 标记产酸克雷伯氏菌 SG-11 研究其在水稻苗期根部的定殖. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (1): 13 ~ 18
- 刘智, 孙建春, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的分离、鉴定及降解性研究. *应用与环境生物学报*, 1999, 5 (增刊): 147 ~ 150
- 沈标, 洪青, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的发光酶基因标记及在土壤中的变化. *农村生态环境*, 2002, 18 (1): 16 ~ 21
- 孙洁梅, 崔中利, 邱珊莲, 李顺鹏. luxAB 基因标记甲基对硫磷降解菌 DLL-1 在土壤和植株根部的生态行为研究. *农村生态环境*, 2003, 19 (1): 43 ~ 46
- 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 ~ 618
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 冯永君, 宋未. 植物内生细菌. *自然杂志*, 2001, 23 (5): 249 ~ 252
- Zhou JB, Li SX, Chen ZJ. Soil microbial biomass nitrogen and its relationship to uptake of nitrogen by plants. *Pedosphere*, 2002, 12 (3): 251 ~ 256
- 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用. *土壤*, 2001, 33 (2): 92 ~ 97
- 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
- 洪坚平, 谢英荷. 不同施肥条件下土壤微生物生物量的研究. *山西农业大学学报*, 1996, 16 (1): 19 ~ 21

COLONIZATION OF METHYLPARATHION-DEGRADING BACTERIUM PSEUDOMONAS PUTIDA DLLBR IN SOIL AND INSIDE VEGETABLE

QIU Shan-lian¹ CUI Zhong-li^{1, 2} WANG Ying¹ WANG Xing-xiang² LI Shun-peng¹

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

2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)

Abstract Green fluorescent protein gene(gfp) labeled Methylparathion-Degrading Bacteria *Pseudomonas putida* DLLBR was cultured in LB medium overnight and then inoculated into the soil in pots with vegetable. After 20 days colonization and distribution of gfp-labeled DLLBR at the surface of the vegetable roots and inside the vegetable were visualized in a living state under a confocal laser scanning microscope. Microscopic observation show that the labeled bacteria had colonized well in the rhizosphere and inside the vegetable. After 30 days the population of DLLBR was counted through spreading the trituration of the sterilized vegetable to LB plates and found to have reached to 10^4 cfu/g root and 10^2 cfu/g stem. Results also show the introduced bacteria brought about some changes in the microbial communities inside the vegetable, especially *Bacillus* that increased in species and count. After 45 days, the DLLBR population in soil was 10^6 cfu/g soil. In addition, we also discovered obvious changes in the microbial communities in the inoculated soil, but only in counts, not in species.

Key words Labeled by green fluorescent protein gene, Confocal laser scanning microscope, Trituration, The microbial communities inside the vegetable, The microbial communities in inoculated soil