

苜蓿内生菌中高效 AHL 降解菌的筛选和鉴定

汪玲玲, 龚伟伦, 刘霏莎

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:从中国新疆、内蒙古和墨西哥等地分离苜蓿内生菌 133 株, 平板筛选到 8 株细菌具有 N-酰基高丝氨酸内酯 (N-Acyl-L-homoserin lactone, AHL) 降解活性, 其中活性较强的菌株有 r-12、r-9 和 R1.5。对 8 株 AHL 降解菌做 AHL 唯一碳源试验, 结果发现菌株 S35 和 N46 在液体 AHL 唯一碳源培养基中生长情况较好, $D_{600\text{ nm}}$ 分别为 0.415 和 0.386, 菌株 r-9 的生长情况最差, $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.015。菌株 R1.5 还具有耐高温、耐盐碱、能分解无机磷、在无氮培养基上生长等优点。经细菌形态学观察、生理生化试验以及 16S rDNA 序列分析, 初步确定菌株 R1.5 为 1 株地衣芽孢杆菌。

关键词:苜蓿内生菌; AHL 降解菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0068-04

Screening and Identification of AHL-Degrading Bacteria from Alfalfa Entophytes

WANG Ling-ling, GONG Wei-lun, LIU Ai-sha

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: One hundred and thirty-three alfalfa entophytes were isolated from the roots and stems of alfalfa grown in Xinjiang Province, Inner Mongolia Autonomous Region in China, and Mexico. Eight isolates showed N-Acyl-L-homoserin lactone (AHL) degrading activity, especially strain r-12, r-9, R1.5 showed stronger activity than others by the plate screening. When AHL used as unique carbon and energy, strain S35 ($D_{600\text{ nm}} = 0.386$) and N46 ($D_{600\text{ nm}} = 0.415$) grew well, but $D_{600\text{ nm}}$ of strain r-9 was 0.015. Strain R1.5 grew well under high temperature, high salt concentration and high pH. Strain R1.5 also grew on the medium without additive nitrogen, and dissolved phosphor. Based on phenotype test, physi-biochemical results and 16S rDNA sequence analysis, strain R1.5 was identified as *Bacillus licheniformis*.

Key words: alfalfa entophytes; AHL-degrading bacteria; screen; identify

N-酰基高丝氨酸内酯 (N-Acyl-L-homoserin lactone, AHL) 是革兰氏阴性细菌群体感应系统的主要信号分子, 当 AHL 分子达到一定的浓度阈值时, 能启动菌体中相关基因的表达^[1]。在许多植物病原菌中, AHL 浓度是引发其致病性的关键因子。降解 AHL 能扰乱和阻断群体感应系统, 阻止病原菌发病, 提高植物的抗病性^[2]。

苜蓿为豆科苜蓿属多年生草本植物, 既有极高的饲用价值, 又有良好的生态效益, 被誉为“牧草之

王”^[3]。近几年来, 随着我国苜蓿种植面积进一步扩大, 病害问题日益严重。目前防治苜蓿病害的方法主要是喷洒化学杀菌剂, 此法费时费力且有药物残留^[4]。采用安全高效的生物防治方法, 是缓解苜蓿病害, 发展绿色农业的必由之路。植物内生菌可产生丰富多样的代谢产物, 具有促生长、抗逆境、抗病害等多种生物活性^[5]。本研究拟从苜蓿植株的根部和茎部分离内生菌, 用于高效 AHL 降解菌的筛选, 为开发新型苜蓿生防菌提供宝贵的种质资源。

收稿日期: 2009-06-18

作者简介: 汪玲玲 (1977—), 女, 讲师, 博士, E-mail: llwang417@scau.edu.cn

基金项目: 华南农业大学校长基金 (4600-k07295); 华南农业大学大学生科技创新活动 (L07050)

1 材料与方法

1.1 苜蓿内生菌的分离与纯化

从新疆、内蒙和墨西哥等地采集苜蓿植株,将根部和茎部分开,0.1%升汞表面消毒后,研磨并稀释涂布在TY平板上(蛋白胨5g,酵母粉3g,蒸馏水定容至1L),28℃培养48h,根据菌落形态不同,挑选代表菌落,纯化3次以上.对分离物做SDS-PAGE全细胞蛋白电泳^[6],去掉图谱完全相同的菌株.共得到133株苜蓿内生菌,4℃保存备用.

1.2 AHL降解菌的筛选

1.2.1 AHL检测用菌 根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (PTi) 为 AHL 产生菌,含有 *traI* 基因,能产生 AHL 分子.根癌农杆菌 NTL4 (PELR4) 为 AHL 指示菌,含有 *PtraI-lacZ* 融合基因和 *traR* 基因,自身不产生 AHL 分子,但能检测外源 AHL 活性并显示蓝色.蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ACCC10263 为 AHL 降解酶的阳性菌.以上菌种均由华南农业大学生命科学学院生命微生物实验室保存.

1.2.2 AHL提取 将 NTL4 (PTi) 接种 YEB 液体培养基(酵母粉5g,蛋白胨10g,NaCl5g,蔗糖5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,蒸馏水定容至1L),28℃、180 $r \cdot min^{-1}$ 培养72h.菌液离心后取上清.用等体积乙酸乙酯抽提,抽干溶剂后用1mL无水甲醇溶解.过滤除菌即为 AHL 粗提液,4℃保存备用.

1.2.3 AHL的平板检测 AHL的平板检测方法参考文献[7].将添加有 X-gal 的 M9-G 平板切成1cm宽,间隔0.3cm的细条,一端挖点样孔.将 NTL4 (PELR4) 培养物从距点样孔中心1cm开始,每隔0.5cm点0.8 μL 菌液,在点样孔内加入20 μL 样品,28℃培养16~20h,观察并记录结果.点样孔内 AHL 含量越低,显色距离越短.

1.2.4 AHL降解菌的筛选 以133株苜蓿内生菌作为供试菌株,分别接种于TY液体培养基,28℃、150 $r \cdot min^{-1}$ 培养24h.向待测菌液加入10 μL AHL 粗提液,以蜡状芽孢杆菌 ACCC10263 为阳性对照,28℃、150 $r \cdot min^{-1}$ 培养24h.上述菌液离心取上清液即为样品,取20 μL 加入如1.2.3所述点样孔内,观察 AHL 降解情况.试验重复3次.

1.3 AHL唯一碳源试验

将筛选到的8株 AHL 降解菌分别接入液体 AHL 唯一碳源培养基中.28℃、150 $r \cdot min^{-1}$ 培养9d.观察供试菌生长情况,测定 D_{600nm} . AHL 碳源培养

基制备:将 AHLs 粗提液(见1.2.2)置于灭菌的器皿中,在超净工作台内将溶剂吹干.加入无碳源无机培养基重新溶解 AHL,使 AHLs 粗提物的终体积比为30 $\mu L/mL$.无碳源无机培养基:20 \times M9 母液5mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, KNO_3 0.1g,双蒸水定容至100mL,121℃灭菌20min后加入10mL无菌0.01mol/L $CaCl_2$.试验重复3次.

1.4 AHL降解菌的抗逆性试验

1.4.1 耐盐性测定 将供试菌株分别接种到 NaCl 质量浓度为40、60、80、100、120、130 $g \cdot L^{-1}$ 的TY液体培养基中,28℃、150 $r \cdot min^{-1}$ 培养2~3d.

1.4.2 耐高低温测定 将供试菌株接种于TY培养基上,分别在4、10、40和60℃(20min)温度下培养.60℃(20min)是指60℃恒温处理20min后,再置于28℃培养.除4和10℃培养3d后观察外,其余处理培养2~3d.

1.4.3 耐酸碱测定 将供试菌株分别接种于pH为4.0、8.0、9.0、10.0、11.0和12.0的TY液体培养基中,28℃摇床上培养2~3d.在有机磷、无机磷和无氮培养基上的生长试验参考文献[8].

以上试验均设3个平行试验.

1.5 菌株 R1.5 的细菌学鉴定

1.5.1 细菌形态学观察及生理生化性状分析 对菌株 R1.5 做细菌形态和生理生化特征测定.生理生化试验包括甲基红、乙酰甲基甲醇、过氧化氢酶、产硫化氢、硝酸盐还原、吲哚产生和明胶液化试验,并测定了其部分碳源利用情况.具体方法见文献[8].

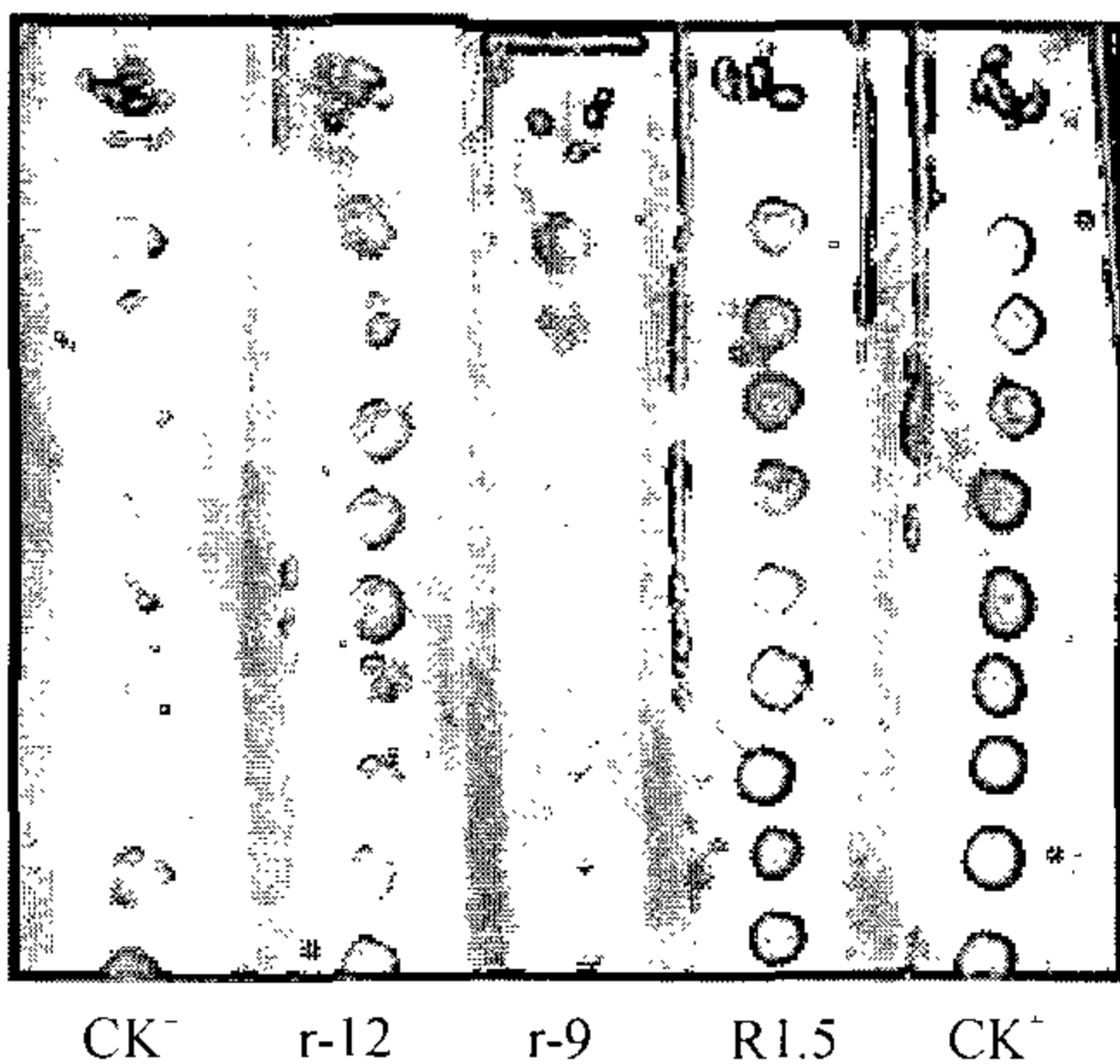
1.5.2 细菌 16S rDNA 序列分析 PCR 扩增的正向引物:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3',反向引物 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3',PCR 反应条件为:94℃预变性5min;94℃1min、45℃1min、72℃1min,30个循环;72℃延伸10min.将经胶回收柱纯化的PCR产物直接送广州英骏生物公司测序.将测序结果提交 GenBank 用 Blast 程序进行序列相似性比较分析.

2 结果与分析

2.1 AHL降解菌的筛选

从中国新疆、内蒙古和墨西哥等地分离133株苜蓿内生菌,其中78株分离自根部,65株分离自茎部.平板筛选试验结果如图1和表1所示,具 AHL 降解活性的菌株共8株,约占供试菌株总数的6%,其

中菌株 r-9、r-12 和 R1.5 降解活性最强. 8 株 AHL 降解菌中从根部分离的菌株有 5 株, 茎部分离的有 3 株, 降解活性最强的 3 株菌均分离自根部. 这可能是由于根表细菌种类和数量较多, 根部内生菌有较多机会接触 AHL 依赖型细菌, 并与其展开生存环境的竞争, 从而利用已有机制或进化出某一代谢途径破坏 AHL 分子结构, 以获得生存优势.



CK⁻: AHL 体积比为 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$; CK⁺: AHL 体积比小于 0.01 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

图 1 供试菌株 AHL 降解酶活性检测

Fig. 1 AHL-degrading activity assay of test strains

表 1 8 株 AHL 降解菌的来源及降解活性

Tab. 1 The source and activity of eight AHL-degrading strains

菌株	来源	分离部位	降解活性 ¹⁾	菌株	来源	分离部位	降解活性 ¹⁾
N46	墨西哥	根部	+	R1.5	墨西哥	根部	++
N54	墨西哥	根部	+	S35	墨西哥	茎部	+
r-9	中国内蒙古	根部	++	S50	墨西哥	茎部	+
r-12	中国内蒙古	根部	++	S54	墨西哥	茎部	+

1) “++”表示降解后的 AHL 体积比为 0.01 ~ 0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$;
“+”表示降解后的 AHL 体积比为 0.05 ~ 0.20 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

2.2 AHL 唯一碳源试验

对筛选到的 8 株 AHL 降解菌做 AHL 唯一碳源试验, 结果如图 2 所示. 菌株 S35 与 N46 的生长量最高, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 9 d 时 $D_{600\text{nm}}$ 分别为 0.415 和 0.386. 平板检测 AHL 降解活性较高的菌株 r-9, $D_{600\text{nm}}$ 仅为 0.015. 一般认为能以 AHL 为唯一碳源和能源的菌株通常具有 AHL 降解活性, 因此常采用 AHL 唯一碳源试验作为 AHL 降解菌的初筛试验^[9], 而以平板检测作为验证试验. 本研究结果显示能够高效降解 AHL 的菌株并不一定能够以 AHL 为唯一碳源正常生长. 这些菌株可能只是利用酰胺酶或者内酯酶等破坏了 AHL 分子结构, 但并不能对其进一步降解. 可见采用 AHL 唯一碳源试验作为 AHL 降解菌的初筛试验可能会带来假阴性结果.

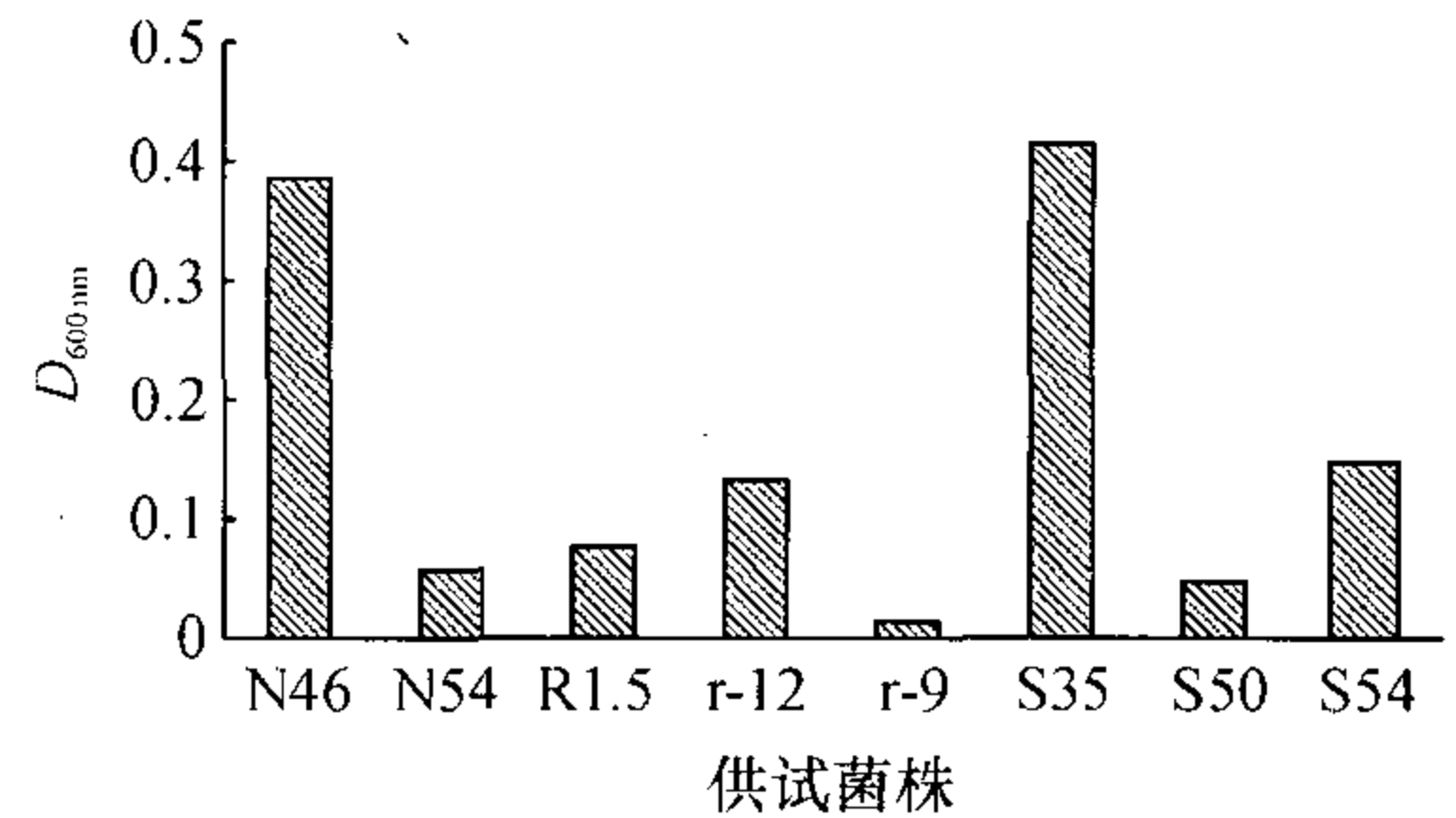


图 2 8 株 AHL 降解菌以 AHL 为唯一碳源和能源的生长试验
Fig. 2 Growing test of eight AHL-degrading bacteria on AHL unique carbon medium

2.3 高效 AHL 降解菌抗逆特性研究

对 AHL 降解活性最高的 3 株细菌 r-9、r-12 和 R1.5 做了不同盐浓度、酸碱条件及温度等条件下的生长情况分析, 结果如表 2 所示. 菌株 R1.5 和 r-12 能耐高温, 40 和 60 $^{\circ}\text{C}$ (20 min) 条件下仍能生长良好. 菌株 r-9 的抗酸碱能力最强, pH 4.0 和 11.0 的酸碱条件下都可以生长, 菌株 R1.5 可以在 pH 11.0 碱性条件下生长, 但不耐 pH 4.0 的酸性条件. 耐盐性最强的是菌株 R1.5, 能够在 $\text{NaCl } 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下生长良好. 此外, 菌株 R1.5 能够在无机磷培养基上形成透明圈, 能够在无氮培养基上生长良好. 综合以上可见, 菌株 R1.5 抗逆性最强, 且可能有助于宿主植物对磷和氮的吸收, 有望进一步研究并开发为苜蓿生防菌.

表 2 菌株 r-12、r-9 和 R1.5 抗逆特性分析¹⁾

Tab. 2 Stress resistance analysis of strain r-12, r-9 and R1.5

生长条件	r-12	r-9	R1.5	生长条件	r-12	r-9	R1.5
4 $^{\circ}\text{C}$	-	-	-	40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	+	+	+
10 $^{\circ}\text{C}$	+	-	-	60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	-	+	+
40 $^{\circ}\text{C}$	+	-	+	80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	-	-	+
60 $^{\circ}\text{C}$ (20 min)	+	-	+	100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	-	-	+
pH 4.0	-	+	-	120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	-	-	+
pH 8.0	+	+	+	130 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	-	-	-
pH 9.0	+	+	+	降解无机磷	-	-	+
pH 10.0	+	+	+	降解有机磷	-	-	-
pH 11.0	-	+	+	无氮培养基	-	-	+
pH 12.0	-	-	-				

1) “+”表示生长;“-”表示不生长.

2.4 菌株 R1.5 的细菌学鉴定

经显微镜观察, 菌株 R1.5 为革兰氏阳性、产芽孢杆菌. 16S rDNA 测序结果与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行相似性比对, 结果显示菌株 R1.5 与地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 16S rDNA 的序列片段有 99% 的相似性. 参照文献 [10-12], 对照表

3 中描述的生理生化性状及细菌形态特征,初步确定菌株 R1.5 为 1 株地衣芽孢杆菌。

表 3 菌株 R1.5 生理生化性状分析

Tab. 3 Physiological and biochemical characteristic of strain R1.5

性状	结果 ¹⁾	性状	结果 ¹⁾	性状	结果 ¹⁾
甲基红	-	甘露醇	+	棉籽糖	-
乙酰甲基甲醇	-	D-山梨醇	+	七叶苷	+
过氧化氢酶	+	淀粉	+	D-果糖	+
产硫化氢	-	D-木糖	+	L-天冬氨酸	-
硝酸盐还原	+	D-葡萄糖酸钠	+	甘氨酸	+
吲哚产生	-	蜜二糖	-	L-精氨酸	+
明胶液化	+	纤维二糖	+	L-脯氨酸	+
乳糖	-	松三糖	-	L-甲硫氨酸	+
蔗糖	+	D-核糖	-	L-苏氨酸	-

1) “+”表示生长;“-”表示不生长。

3 讨论与结论

AHL 信号分子在植物病原菌中调控着许多致病基因的表达,AHL 降解菌能有效地抑制该类信号分子的积累,从而阻断病原细菌的发病机制。目前人们正试图通过寻找和利用 AHL 降解菌,控制各类植物病害^[13-15]。本研究从苜蓿内生菌中筛选到 8 株 AHL 降解菌,这不仅丰富了 AHL 降解菌的种质资源,而且由于这些菌株分离自苜蓿组织,与宿主有较高的亲和性,从而更具实际应用价值。

本研究中菌株的 AHL 降解活性与以 AHL 为唯一碳源生长情况之间存在不一致性。菌株 r-9 的 AHL 降解活性接近蜡状芽孢杆菌 ACCC10263,而该菌在 AHL 唯一碳源培养基上却几乎不能生长。菌株 S35 和 N46 在 AHL 唯一碳源培养基上生长情况最好,但平板检测到的 AHL 降解活性不及 r-9、r-12 和 R1.5。推测不同类型的细菌降解 AHL 的目的不同。有些细菌适应生存的需要,能在特定环境中利用 AHL 为能源和碳源生长,这类菌产生的 AHL 降解酶系更为完整,先通过酰胺酶或者内酯酶破坏 AHL 分子结构,再进一步将其分解,得到较为简单的碳水化合物从而被菌体利用,如菌株 S35 和 N46;而另一些类型的细菌降解 AHL 只是防御或者竞争的需要,只要破坏 AHL 分子继而破坏对方的群体感应系统就达到目的,这类细菌往往含有较高的酰胺酶或者内酯酶,不含或者含有少量的用于进一步降解 AHL 分子的其他酶系,如菌株 r-9 等。

抗逆试验结果表明:菌株 R1.5 耐高温,在 40 和 60 °C (20 min) 条件下仍能生长良好;耐盐碱,在 pH11.0 的碱性条件以及 120 g · L⁻¹ NaCl 的高盐条件下生长良好;能在无机磷培养基形成溶磷圈,在无氮培养基上正常生长,具有潜在固氮溶磷功能。经细菌形态、生理生化鉴定和 16S rDNA 全序列分析,初步确定菌株 R1.5 为 1 株地衣芽孢杆菌。

参考文献:

- [1] 郭嘉亮,陈卫民. 细菌群体感应信号分子与抑制剂研究进展[J]. 生命科学,2007,19(2):224-232.
- [2] 邱健,贾振华,马宏,等. 一株降解 N-酰基高丝氨酸内酯酵母菌菌株的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学报,2007,47(2):355-358.
- [3] 李雪枫,王宁,吴韶寰. 苜蓿的应用价值及展望[J]. 宁夏农学院学报,2003,24(1):76-82.
- [4] 赵培宝. 苜蓿常见病害的发生与综合防治[J]. 特种经济动植物,2003(6):40-42.
- [5] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报,2001,43(9):881-892.
- [6] SAMBROOK J,RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 3 版. 北京:科学出版社,2002:1716.
- [7] 袁茵,鲁欣. 具细菌群体感应抑制活性海洋细菌的筛选鉴定[J]. 生物技术,2006,16(4):30-33.
- [8] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:90-92.
- [9] 史晓,宫倩红,于文功,等. 一种 AHL 降解菌株的高效筛选方法[J]. 中国海洋大学学报,2007,37(5):728-732.
- [10] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Determinate Bacteriology: Version 8[M]. 中国科学院微生物研究所,译. 北京:科学出版社,1984.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:353-398.
- [12] 戈登 R E. 芽孢杆菌属[M]. 蔡妙英,译. 北京:农业出版社,1983.
- [13] DONG Yi-hu, XU Jin-ling, LI Xian-zhen, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3526-3531.
- [14] 宋水山,贾振华,邢志华,等. 植物对细菌群体感应系统的反应[J]. 细胞生物学杂志,2005,27(4):427-430.
- [15] 邱健,贾振华,李承光,等. 细菌群体感应淬灭酶的研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):139-143.

【责任编辑 李晓卉】