

# 一株耐酸野生葛藤(*Pueraria lobata*)根瘤菌的筛选 与耐酸机理初步研究

辜建平, 张 磊\*, 魏世清, 张 琴, 方德华

(西南大学资源环境学院 重庆 400716)

**摘 要** 从重庆市北碚区缙云山酸性黄壤 (pH4.6) 上生长的葛藤根瘤中分离到一株耐酸葛藤根瘤菌 PR389, 能在 pH4.3 的 YMA 培养基上正常生长, 而一般根瘤菌最适生长 pH 值为 6.5 ~ 7.5, 说明 PR389 为一株耐酸葛藤根瘤菌。通过质子通量试验发现, 与不耐酸的菌株相比, PR389 的细胞膜能阻止过量的  $H^+$  进入细胞, 表明 PR389 具有某种能力使之在低酸性环境下不受到伤害。在耐酸性试验中, PR389 在加氯霉素的强酸性 (pH3.8) YMA 培养液中表现出来的耐酸性被氯霉素抑制, 推测胞内特异蛋白质的诱导合成是 PR389 具有耐酸性的原因。

**关键词** : 葛藤根瘤菌; 筛选; 耐酸性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)04-0653-04

葛藤(*Pueraria lobata*)又名葛,俗称野葛,属豆科葛属一种多年生落叶藤本植物,其分布极广<sup>[1]</sup>,适应性极强,对土壤要求不严,无论中性和微酸性土壤都能生长<sup>[2]</sup>,与其共生的根瘤菌也能在不同酸性土壤中被分离。Gemmell 和 Roughley (1993)发现,与中性土壤相比,从酸性土壤中分离出的根瘤菌具有更强的耐酸能力<sup>[3]</sup>。因此,从生长于酸性土壤的葛藤根瘤中,有望分离到耐酸的葛藤根瘤菌。

国内外对微生物耐酸机制的研究比较深入,其机制主要包括细胞膜组分的改变,如膜蛋白、膜脂肪酸等。Cheville 等 (1996)对 *Escherichia coli* O157:H7 的 *rpoS* 因子进行研究发现,酸性诱导可以增强其生长期的耐酸性<sup>[4]</sup>。Kierar (1999)对 *E. coli* O157:H7 进行了耐酸及酸性诱导的试验,膜组成蛋白的双向凝胶电泳结果表明,酸性诱导使细胞中两种蛋白的表达增加,而另外五种蛋白的表达被抑制<sup>[5]</sup>。Vaida 等 (2003)鉴定了 *E. coli* 细胞中由酸性环境 (pH < 5.0) 诱导的一个 *asr* (Acid shock RNA) 基因,该基因所编码的蛋白质 *Asr* 的功能虽还不清楚,但对 *E. coli* 耐受 pH4.5 的酸性环境而言是必需的,且经过诱导后的 *E. coli* 能耐受 pH2.0 的酸性环境<sup>[6]</sup>。除以上几种耐酸机制的研究外, $F_1F_0$ -ATP 酶对细胞内 pH 值的调节作用、大分子的保护和/或修复、胞内碱性物质的产生、细胞液浓度等机制也在研究中<sup>[7]</sup>。本试验通过筛选酸性土壤中的葛藤根瘤菌,在酸性条件下的生长变化、外界低 pH 值环境对其耐酸特性的影响以及对培养环境的反作用等几个方面的研究,旨在找到葛藤根瘤菌耐酸特性的证据,并探讨葛藤根瘤菌耐酸的机理,为其他豆科根瘤的耐酸机理研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** PR386、PR387、PR388、PR389 分离自重庆市北碚区缙云山国家森林公园生态保护区(海拔 650m)酸性 (pH4.6) 黄壤中的葛藤根瘤,PR21(酸敏感的葛藤根瘤菌)为本实验室分离保存。

**1.1.2 培养基** 菌株培养使用改良 YMA 培养基(分离根瘤菌时加入 10mL 0.4% 刚果红液);回接复证实验使用无氮培养液, pH 值均用 1% HCl 和 1% NaOH 调节。

**1.1.3 主要试剂和仪器** :酵母粉( Yeast extract ),琼脂粉为 India 分装,氯霉素为 Sigma 公司分装,其余试剂为国产分析纯。根瘤菌用 Olympus (VANOX) 镜检。

### 1.2 菌株的分离与纯化

选取个大、粉红色新鲜根瘤,置 95% 乙醇中浸泡 30s;转入 0.1%  $HgCl_2$  溶液中浸泡 5min,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,用灭菌扁头镊子将根瘤压碎,挑取根瘤中间组织接 λYMA 试管斜面,置 28℃ 恒温培养。采用在刚果红 YMA 培养基反复划线,结合镜检,将具有典型根瘤菌菌体特征者接入斜面培养基保存。

菌落纯化后进行回接复证实验。复证时回接葛藤,用无氮培养液进行盆栽试验,各菌株接种处理及 CK 分设 3 次重复,人工温室 (25 ~ 28℃) 培养,每日光照 12 ~ 14h,15 ~ 25d 后观察结瘤情况。

### 1.3 菌株生长曲线测定

将已活化的斜面菌苔用无菌水洗出并振荡均匀,吸取

基金项目: 国家“973 项目”(001CB108905)

\* 通讯作者。Tel 86-23-68250437; Fax 86-23-68250444; E-mail: echo@swau.cq.cn

作者简介: 辜建平 (1980 - ) 男, 成都人, 硕士研究生, 研究方向为微生物与植物营养研究。E-mail: gwping80@163.com

收稿日期 2005-09-26; 接受日期 2005-11-21; 修回日期 2006-04-15

20mL 接种于 350mL 培养液中,设 3 个重复;放入摇床振荡(28℃,100r/min)培养。每 30min 用 722 分光光度仪(波长 600nm)测定一次培养液的吸光度;至吸光度有明显升高时每 15min 测定一次吸光度,同时在对数期开始后每隔 2h 测定活菌数,计算代时(公式如下)<sup>[8]</sup>。生长曲线用 Microsoft Excel 软件绘制。

$$G = \frac{1}{3.32(\lg N_t - \lg N_0)}$$

其中:  $N_0$ -对数期开始时的细菌数;  $N_t$ -对数期 t 时细菌数; G-代时。

1.4 质子通量试验及诱导 ATR 试验(Proton flux assay and Acid tolerance response assay)

借鉴 Bender 等(1986)<sup>[9]</sup>的方法和 Leyer 等(1995)<sup>[10]</sup>进行质子通量试验及诱导 ATR 试验。将 PR389、PR21 经活化后在中性培养液中振荡培养至指数期中期,经离心、洗涤收集活细胞 1~3g(湿重),转入 50mL 0.1mol/L 的 KCl 溶液中制成菌悬液,水浴中保温(28±1℃)并搅拌。用 pH 仪测定其酸度,待 pH 值稳定 2min 以上,迅速加入 0.05mol/L 的 HCl,将 pH 值调至 3.4±0.1,并在 15min 之内,每 30s 记录一次 pH 值,重复 3 次。同样,将中性培养液培养至指数期中期的两种菌悬液,经离心、洗涤收集活细胞 1~3g,转入酸性(pH5.2)培养液中振荡培养 1h,然后重复上述冲击方法并测定 pH 值变化,计算质子通量率。同时测定不同菌株两种处理前后的 CFU 值,计算存活率。

表 1 不同根瘤菌菌株回接葛藤的结果比较与根鲜重和结瘤情况

Table 1 The experiment of *Pueraria lobata* inoculated by different rhizobium strains

Rhizobium strain	Average FW of roots/g	Average FW of plant biomass/g	Nodulation Rate/%	Average No. of nodules per plant	FW of nodules per plant/g
PR389	0.6730 A	2.3286 A	81.82	3	0.0471
PR390	0.6224 A	1.5143 B	58.33	1	0.0286
PR387	0.4873 A	1.4840 B	60.00	1	0.0300
PR386	0.4623 AB	1.4601 B	62.50	1	0.0298
PR388	0.4411 AB	1.2918 B	77.78	3	0.0341
CK	0.0976 B	0.3518 C	20.00	0.4	0.0055

Notation: FW was fresh weight and A meant significance of difference with α=0.01.

2.2 酸性培养液对 PR389 菌株生长曲线的影响

按照 1.3 方法,测定酸性和中性环境中 PR389 菌株生长的差异。其中,中性环境测定时间为 30h,酸性环境的测定时间为 60h,所得到的生长曲线见图 1。在中性 YMA 培养液

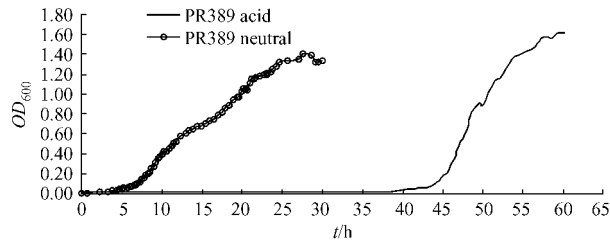


图 1 酸性和中性环境中 PR389 菌株生长曲线的差异  
Fig.1 The different growth curves of strain PR389 in acidic and neuter environment.

1.5 氯霉素对 PR389 的耐酸性影响试验

将 PR389 在中性培养液中培养至指数期中期,按 5% 的接种量加入到 4 种不同处理的培养液中,它们分别是:Ⅰ. NC<sup>+</sup>(neutral Chloramphenicol<sup>+</sup>):中性培养液中加入氯霉素,使最终浓度为 5μg/L;Ⅱ. AC<sup>+</sup>(acid Chloramphenicol<sup>+</sup>):酸性培养液(pH3.8)中加入氯霉素,使最终浓度为 5μg/L;Ⅲ. AC<sup>-</sup>:酸性培养液(pH3.8)不加氯霉素;Ⅳ. NC<sup>-</sup>:中性培养液不加氯霉素。每处理 3 个重复,28±1℃、100r/min,振荡培养 285min,间隔一定时间活菌计数(CFU/mL)。

1.6 统计分析

采用 DPS 3.01 统计软件进行方差分析。

2 结果和讨论

2.1 菌株相关形态特征描述及回接试验

选择酸性黄壤上的葛藤根瘤作为分离对象,经过多次在酸性刚果红 YMA 培养基平板上的分离、纯化,得到葛藤根瘤菌纯菌株。回接复证试验和接种后葛藤植株生物产量的结果见表 1。以接种 PR389 菌株的效果最好,其根鲜重、植株鲜重分别比 CK 提高 570% 和 566%,植株鲜重和根鲜重的 F 值分别为 14.08、6.10,差异达到极显著的水平[F<sub>0.01</sub>(12,17)=3.45]。由此说明,PR389 菌株不仅能高效地与葛藤根系形成根瘤,而且以有效根瘤居多;可见该菌株与葛藤之间能形成较好的共生固氮体系。

中,PR389 菌株的生长代时为 130min;酸性培养液中 PR389 耐酸菌株经过 40h 漫长的准备,步入了对数期,并且其对数期与中性培养液中菌株的对数期时间很接近,在 pH4.5 的 YMA 培养液中,代时为 104min。

2.3 PR389 菌株的生长对培养液 pH 值的影响

采用酸度计测定 PR389 菌株生长的培养液 pH 值变化(图 2)。在 pH4.5 YMA 酸性培养液接入 PR389 菌株,培养 40h 后 pH 值达到 4.8,仅比未接菌前的 pH 值升高了 0.3,属于 pH 值变化“平缓期”。之后经历了 pH 值的“上升期”(40~50h,pH4.8~7.2)和“下降期”(50h 后,pH7.2~4.8)。而在中性环境中,培养液的 pH 值始终处于中性。

2.4 耐酸菌株 PR389 和酸敏感菌株 PR21 酸诱导结果比较

按照 1.4 方法对 PR389 进行质子通量试验及诱导 ATR

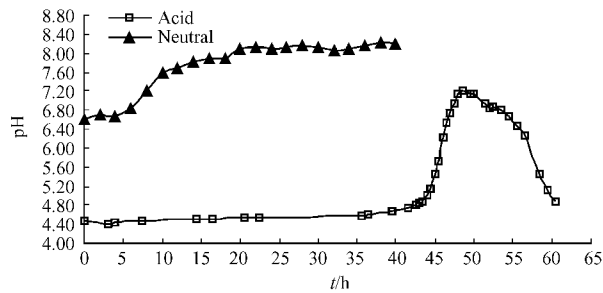


图2 PR389 菌株的生长对培养液 pH 值的影  
Fig.2 Effect of PR389 growth to the pH value of medium.  
试验。图 3-A 表明 , 无论是否诱导 , PR21 酸敏感菌株 pH 值在 14min 内变化很小 , 图 3-B 表明 , 未经诱导处理的 PR21 菌株质子通量率在 2min 达到最大值 36.68nmol H<sup>+</sup> / ( mg · min ) , 第 7min 开始 , 未诱导处理质子通量率低于诱导处理的质子通量率。而经诱导处理的 PR21 菌株质子通量率始终保持在

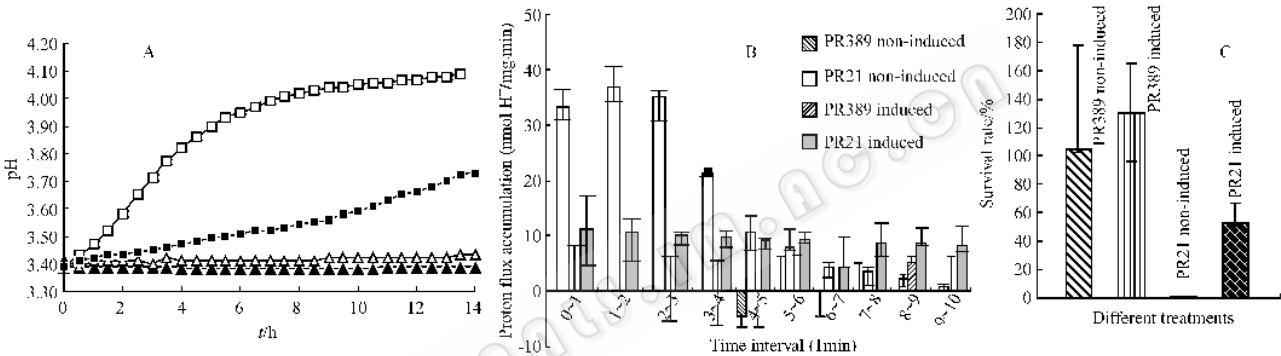


图3 诱导处理下菌株的耐酸性变化  
Fig.3 The change of acid resistance of strains induced by acid. A : pH value change of PR389 ( ▲ ) and PR21 ( □ ) non-induced , PR389 ( △ ) and PR21 ( ■ ) induced. B : Proton flux accumulation ( nmol H<sup>+</sup> / ( mg · min ) ) variation of PR389 and PR21. C : The survival rate ( survival cells % ) of PR389 and PR21.

2.5 氯霉素对 PR389 的耐酸性有显著影响

氯霉素能与 50S 亚基结合 , 抑制肽酰基转移酶 , 从而抑制肽链的延伸 , 干扰蛋白质合成<sup>[11]</sup>。图 4 显示 , NC<sup>+</sup> 和 NC<sup>-</sup> 的 logCFU 曲线几乎重合且呈水平线 , 说明在 285min 内中性 YMA 培养液 PR389 活菌数的变化不受氯霉素的影响。AC<sup>+</sup> 和 AC<sup>-</sup> 的 logCFU 曲线的变化显示在远低于自然生境 pH 值环境下 PR389 耐酸能力的丧失过程。氯霉素对 PR389 的耐酸性影响进行多重比较 , 酸性 YMA 培养液中加入氯霉素 , 极显著抑制了耐酸 PR389 的生长。这一试验结果说明 , PR389 耐酸菌株在远低于自然环境酸度范围条件下 , 其细胞膜已无法保护细胞 , 菌体细胞开始衰亡。而在同样酸度的 YMA 培养液中加入氯霉素后 , PR389 耐酸菌株会提前丧失其耐酸性。由此推测 , 在 pH3.8 的 YMA 培养液中 , 氯霉素通过抑制蛋白质合成的作用 , 加速了 PR389 耐酸菌株细胞衰亡的过程。

综上所述 , 从野生耐酸葛藤根瘤中分离、筛选到的能与葛藤( *Pueraria lobata* )形成高效固氮体系的 PR389 耐酸根瘤菌菌株 , 具有较强的耐酸能力 , 并且这种特性来自于对酸性土壤的长期适应 , 这一点可以从酸性诱导试验看出。另外 ,

10.0nmol H<sup>+</sup> / ( mg · min ) 左右。上述结果说明 , PR21 菌株通过 pH5.2 的 YMA 培养液诱导 , 其细胞膜可以提高对 H<sup>+</sup> 毒害的防御能力 , 但不能完全阻止 H<sup>+</sup> 进入细胞 , 只能减缓 H<sup>+</sup> 进入细胞膜的速率。这一特性与 Vaida 等( 2003 ) 在肠道微生物上的研究结果相似。

图 3-A 显示 , 在加入 HCl 溶液后 , 经诱导和未诱导处理的 PR389 菌悬液 pH 值在 14min 内没有发生明显变化。在图 3-A 中 , 菌株 PR389 的两条曲线几乎平行。而图 3-B 中 , 经诱导和不诱导处理的 PR389 菌株细胞的质子通量率在大部分时段内几乎为零。由此说明 , PR389 耐酸菌株对诱导并不敏感。

图 3-C 可以更直接地反映诱导处理效果 , PR389 耐酸菌株的存活率并不会因诱导与否而发生明显变化。而 PR21 酸敏感菌株经诱导后的存活率从 0.25% 增加到 53.33%。由此可见 , 酸性诱导的确可以提高 PR21 酸敏感菌株对 H<sup>+</sup> 毒害的抵御能力 , 这与图 3 中的 A、B 两图所反映的结果一致。

通过生长曲线的测定以及氯霉素对其耐酸性的影响结果可以推测 , PR389 是利用细胞膜对 H<sup>+</sup> 运输进行控制 , 从而产生了较强的耐酸性 , 这种耐酸性只在酸性环境中出现 , 并且受蛋白质合成的影响。

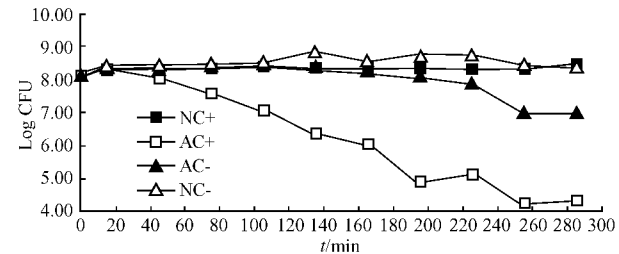


图4 抑制蛋白质合成后 PR389 的耐酸性试验结果  
Fig.4 Result of acid-resistance of PR389 after restraining protein-synthesizing. I . Neuter medium , Chloramphenicol<sup>+</sup> ( NC<sup>+</sup> , ■ ) ; II . Acid medium ( pH3.8 ) , Chloramphenicol<sup>+</sup> ( AC<sup>+</sup> , □ ) ; III . Acid medium ( pH3.8 ) , Chloramphenicol<sup>-</sup> ( AC<sup>-</sup> , ▲ ) ; IV . Neuter medium , Chloramphenicol<sup>-</sup> ( NC<sup>-</sup> , △ ).  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 吴德邻, 陈忠毅, 黄向旭. 中国葛属的研究. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(3): 12–21.
- [ 2 ] 王家玉. 葛藤的经济价值和开发利用. 生物学通报, 1998, 33(6): 46–47.
- [ 3 ] Gemmell LG. Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid factors in agar medium. *Soil Biol Biochem*, 1993, 25: 1447–1452.
- [ 4 ] Cheville AM, Arnold KW. *RpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1822–1824.
- [ 5 ] Kieran NJ, Lynn O, Conor P. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 3048–3055.
- [ 6 ] Seputien V, Motiejnas D, Suiedlis K, *et al.* Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185: 2475–2484.
- [ 7 ] Paul DC, Colin H. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67: 429–453.
- [ 8 ] 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学. 第五版. 北京: 中国农业出版社, 2000, 92–93.
- [ 9 ] Bender GR, Sutton SVW. Acid tolerance, proton permeability, and membrane ATPases of oral *Streptococci*. *Infect Immun*, 1986, 53: 331–338.
- [ 10 ] Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3752–3755.
- [ 11 ] Schlünzen F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 2001, 413: 814–821.

## Primary study on acid tolerance mechanism of a wild aciduric *Rhizobium* strain isolated from *Pueraria lobata*

GU Jian-ping, ZHANG Lei\*, WEI Shi-qing, ZHANG Qin, FANG De-hua

(College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract** : An aciduric *Rhizobium* strain, named as PR389, was isolated from the nodule of wild *Pueraria lobata* which grew in yellow soil (pH 4.6) on the Jin-yun Mountain in Bei-bei, Chong-qing city. The isolated strain, which could grow under pH 4.6 distinct from the optimal pH 6.5–7.5 for rhizobium, showed some typical features of aciduric rhizobium. This was also confirmed by the proton flux assay. Compared to the acid-sensitive *Rhizobium* strain PR21, the cell membrane of PR389 could hold back excessive H<sup>+</sup> entering cell. This feature can protect PR389 from harm of acid. In the test of acid tolerance, the aciduric ability of strain PR389 under low acidity (pH 3.8) was restrained by antibiotic chloramphenicol. It was speculated that special proteins in the cells of PR389 could be induced and synthesized in acidic environment.

**Keywords** : *Rhizobium* of *Pueraria lobata*; Selection; Acid tolerance