

外源甜菜碱提高恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) DLL-1 耐盐性的研究

何 健, 蒋建东, 贾开志, 黄 星, 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院微生物学系 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 研究了外源甜菜碱对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) DLL-1 耐盐性的影响并对其渗透保护机制进行了初步的探讨。结果表明培养基中添加甜菜碱可以改善 DLL-1 细胞在高盐培养基中的生长情况, 添加 150mg/L 的甜菜碱可以使 DLL-1 在 1.2mol/L NaCl 的基础盐培养基中生长, 添加 10mg/L 的甜菜碱就足以显著缩短渗透胁迫条件下 DLL-1 细胞的延滞期和代时, 增加生长量; 和不添加对照相比, 延滞期由 24h 缩短到 6h, 代时由 60min 缩短到 35.7min, 最大生长量 OD_{610} 由 1.29 增长到 1.57。在渗透胁迫条件下, 细胞从外界快速吸收外源甜菜碱来代替自身相容性溶质的合成。

关键词 外源甜菜碱; 渗透保护; 耐盐性; *Pseudomonas putida* DLL-1

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2006) 01-0154-04

土壤干旱和盐渍化导致的渗透胁迫是导致微生物接种剂失水乃至死亡的主要因素, 提高接种微生物对高盐或干旱环境的适应能力对接种微生物的存活和功能的发挥具有非常重要的意义。相容性溶质(Compatible solutes)是耐盐微生物在高渗透环境中细胞内积累的小分子物质, 其特点是高度水溶性、不带静电荷, 在细胞内高浓度积累不会影响生物大分子如蛋白质和核酸的正常生理功能, 但可以平衡细胞外的渗透压^[1,2]。现已发现的相容性溶质种类主要有海藻糖、氨基酸(谷氨酸和脯氨酸)、氨基酸衍生物(甜菜碱、四氢嘧啶)等。甜菜碱(Glycine betaine, N,N,N-三甲基甘氨酸)是一类非常有效的相容性溶质, 存在于一些耐盐的细菌和植物中; 外源甜菜碱能显著提高肠道细菌和根瘤菌等非耐盐细菌的耐盐抗旱能力^[3-6]。国内对甜菜碱等相容性溶质合成、通道蛋白及基因克隆表达方面的研究较多^[7-11], 但对于外源甜菜碱提高微生物对渗透胁迫适应性的作用机制研究不多。

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)是土壤和水体环境中分布非常普遍的微生物, 具有很多重要的生态功能, 如具有强大的降解能力, 能降解 100 多类不同结构的化合物, 包括难降解的烃类化合物和芳香族化合物; 具有脱氮(硝化)和脱硫效果, 在氮、硫元素的地球化学循环中扮演重要的角色; 对植物具有促生作用, 对植物致病菌具有拮抗作用等等^[12]。在生物修复、煤炭脱硫、生物催化、生物肥料和生物防治等方面具有广阔的应用前景。但是大量的研究表明, 恶臭假单胞菌的耐盐抗旱能力较差, 接种到大田环境非常容易死亡^[13,14]。因此研究如何提高其耐盐抗旱能力及其机制是一个迫切需要解决的问题。DLL-1 是本实验室分离的一株能降解有机磷

农药的恶臭假单胞菌, 本文研究了外源添加甜菜碱对此菌株耐盐能力的影响并对其作用机制进行了初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *Pseudomonas putida* DLL-1 为本实验室分离保存的降解有机磷农药的菌株。

1.1.2 M9 基础盐培养基 每升含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g, K_2HPO_4 1.4g, KH_2PO_4 0.6g, MgSO_4 0.1g, CaCl_2 0.1g, 葡萄糖 5g, NaCl 视需要添加, pH7.5; **LB 培养基** 每升含牛肉膏 3.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 视需要添加 pH7.5。

1.2 DLL-1 生长量和细胞数量的测定

DLL-1 的相对生长量通过测定菌液的 OD_{610} 来衡量, 如 OD_{610} 超过 1.0 则用相应的培养基稀释到 1.0 以下来测定, 细胞数量采用稀释涂布平板法测定。

1.3 细胞内相容性溶质的提取和测定

1.3.1 相容性溶质的提取 DLL-1 于不同盐浓度的基础培养基 100mL 中培养到对数生长期后期, 6000r/min 离心 15min, 小心倾去上清, 用等浓度的 NaCl 洗涤, 6000r/min 离心 15min, 菌泥用 3mL 10% 高氯酸溶液悬浮并立刻于液体快速混合器上震荡均匀, 处理 10min, 用 5mol/L KOH 调节 pH 到中性并沉淀高氯酸根, 12000r/min 离心 20min, 取上清定容到 5mL。

1.3.2 甜菜碱含量的测定(碘结晶沉淀法^[15]) 取 0.5mL 样品于 5mL 离心管中, 加入等体积的 1.5mol/L H_2SO_4 后置于冰水混合物中冷却 1h, 加入预先冷却到 0℃ 的 $\text{KI} - \text{I}_2$ 溶液 0.8mL, 4℃ 反应 16h, 取出于 0℃、12000r/min 离心 20min, 倾去

基金项目 国家“863 计划”(2003AA241150) 江苏省科技攻关项目(BE2003343)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314 E-mail: hsp@njau.edu.cn

作者简介 何 健(1973-), 男, 江西南康人, 讲师, 研究方向为环境微生物与环境微生物工程。E-mail: hejian@njau.edu.cn

收稿日期 2005-05-09 接受日期 2005-07-06 修回日期 2005-11-12

上清并用尖头的吸管小心把剩余的溶液吸干,加入 9mL 的 1,2-二氯乙烷溶解沉淀,并于震荡器上震荡 5min 以保证沉淀完全溶解,2~2.5h 后于 365nm 处测定其吸光度。

1.3.3 氨基酸含量的测定 茚三酮比色法,参照南京建成生物工程公司试剂盒使用说明书。

1.4 海藻糖的测定

用 0.5mol/L 的冷三氯乙酸提取,采用硫酸蒽酮比色法^[16,17]测定。

2 结果

2.1 DLL-1 本身的耐盐性

试验表明,培养基成分、接种量等因素对 DLL-1 的耐盐能力的影响很大 在不同盐浓度的完全培养基和 M9 基础盐培养基中按 1/100(V/V)的接种量(接种后培养基中细胞浓度约 1.2×10^7 cfu/mL)接种,30℃ 摇床培养 48h 后通过测定菌液的 OD_{610} 变化来考察菌的生长情况,结果表明,在营养丰富的完全培养基中,DLL-1 最高可耐 1mol/L(约 5.8%)的 NaCl,而在营养较贫乏的基础盐培养基中,DLL-1 最高可耐 0.6mol/L(约 3.5%)的 NaCl(图 1-A、B)。但是进一步的研究表明在 M9 基础盐培养基中,加大接种量可以使 DLL-1 在更高的盐浓度培养基中生长(图 2),在 1/100(V/V)、1/20(V/V)(接种后培养液中细胞浓度约 6.0×10^7 cfu/mL)和 1/10(V/V)(接种后培养液中细胞浓度约 1.2×10^8 cfu/mL)接种量条件下,其最高生长盐浓度分别为 0.6mol/L(3.5%) NaCl、0.8mol/L(4.7%) NaCl 和 1.0mol/L(5.8%)NaCl。说明大接种量具有“群体优势”,可以帮助细胞适应渗透胁迫而存活。

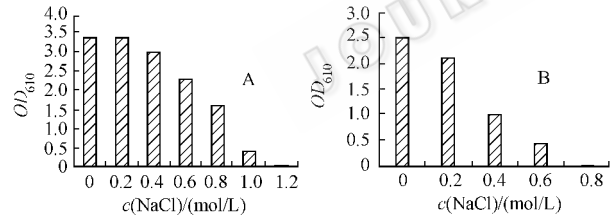


图 1 DLL-1 在不同盐浓度的完全培养基(A)和基础盐培养基(B)中的生长

Fig.1 Growth of DLL-1 in LB medium (A) and M9 chemically defined medium (B) with different salinity

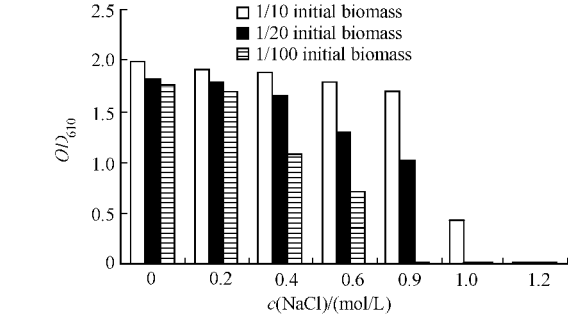


图 2 接种量对 DLL-1 在不同盐浓度 M9 培养基中生长的影响

Fig.2 Effect of initial biomass on the growth of DLL-1 in M9 chemically defined medium with different salinity

2.2 外源添加甜菜碱对 DLL-1 耐盐能力的影响

在不同盐浓度的 M9 基础盐培养基中添加不同浓度甜菜碱后,按 1/100(V/V)的接种量接种 DLL-1 细胞,30℃ 摇床培养,定时取样于 610nm 测定菌液的 OD 值,考察菌的生长情况 结果表明,添加甜菜碱可以显著改善 DLL-1 在高盐培养基中的生长情况,且提高的幅度与添加的甜菜碱成正比,添加 10mg/L 的甜菜碱就显示出较好的抗渗透胁迫效果,而添加 150mg/L 的甜菜碱可以使 DLL-1 在 1.2mol/L(7.2%) NaCl 的基础盐培养基中生长(图 3)。

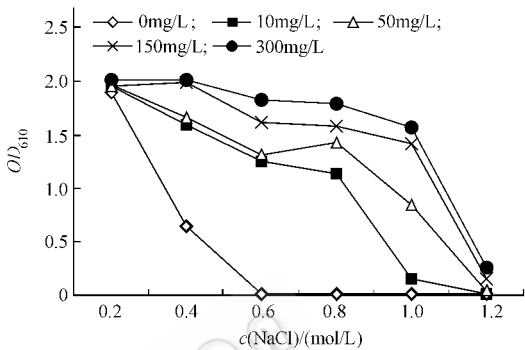


图 3 添加甜菜碱对 DLL-1 在不同盐浓度 M9 培养基中生长的影响

Fig.3 Effect of exogenously supplied glycine betaine on the growth of DLL-1 in M9 chemically defined medium with different salinity

2.3 外源添加甜菜碱对 DLL-1 延滞期、代时和最大生长量的影响

为研究添加甜菜碱改善 DLL-1 对盐份渗透胁迫适应性的机理,考察了添加甜菜碱对 DLL-1 延滞期、代时和最大生长量的影响,于 0mol/L NaCl 和 0.6mol/L NaCl 的 M9 基础盐培养基中添加 10mg/L 的甜菜碱,按 1/100(V/V)的接种量接种 DLL-1 细胞,30℃ 摇床培养,定时取样测定菌液的 OD_{610} ,考察菌的生长情况 结果表明,添加甜菜碱对于在 0mol/L NaCl 条件下生长的 DLL-1 细胞的延滞期、生长量和代时均没有显著的影响,但可以显著缩短 0.6mol/L NaCl 条件下生长的 DLL-1 细胞的延滞期和代时,增加生长量 添加甜菜碱和不添加对照相比,延滞期由 24h 缩短到 6h,代时由 60min 缩短到 35.7min,生长量 OD_{610} 由 1.29 增加到 1.57(表 1)。

表 1 外源甜菜碱对 DLL-1 的延滞期、代时和生长量的影响

Table 1 Effect of exogenously supplied glycine betaine on the lag time, generation time and final biomass of DLL-1

Addition	NaCl level / (mol/L)	Lag time /h	Generation time /min	Final biomass (OD_{610})
Betaine	0.6	6.0	35.7	1.57
	0	3.0	23.6	2.2
CK	0.6	24.0	60.0	1.29
	0	3.0	25.4	2.1

2.4 甜菜碱在细胞内的积累及对各相容性溶质含量的影响

将 DLL-1 在 M9 培养基培养后接种到加入 1.0mol/L NaCl 的 M9 培养基中进行渗透胁迫,提取并测定了 DLL-1 细胞各

相容性溶质;图 4-A 为 1.0mol/L NaCl M9 培养基中加入 150mg/L 的甜菜碱后冲击情况,图 4-B 为不加甜菜碱对照组情况。图示结果表明在培养基中没有相容性溶质时,DLL-1 自身能合成甜菜碱、海藻糖和游离氨基酸等多种相容性溶质平衡外界的渗透压,但达到平衡的时间较长,需要 5~6h,细胞内主要相容性溶质为甜菜碱、海藻糖和游离氨基酸,分别占总相容性溶质的摩尔百分比为 60.9%、31.7% 和 7.4% 而培养基中添加甜菜碱的处理,盐份渗透胁迫后细胞内的甜菜碱含量快速上升,1~2h 内达到平衡,甜菜碱、海藻糖和游离氨基酸的摩尔百分比分别为 86.9%、7.1% 和 6.0%,甜菜碱相对含量上升,海藻糖和游离氨基酸相对含量下降,说明在有外源甜菜碱条件下进行渗透胁迫时,细胞能够从培养基中吸收甜菜碱作为相容性溶质来代替相容性溶质合成,这样不但可以使细胞快速适应外界渗透压的变化而且能够最大限度的节约碳氮源和能量。

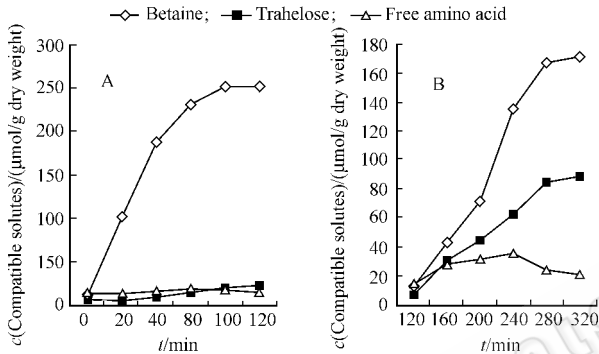


图4 外源甜菜碱对 DLL-1 细胞内相容性溶质积累的影响

Fig.4 Effect of exogenous glycine betaine on the accumulation of compatible solutes in DLL-1 cells

A Presence of 10mg/L glycine betaine; B CK.

3 讨论

本试验和其它的一些研究结果表明,外源相容性溶质如海藻糖、甜菜碱和四氢嘧啶可以改善一些非耐盐菌如肠道细菌、根瘤菌和假单胞菌对盐份渗透胁迫的适应性,其机制在于盐份渗透胁迫时,外源相容性溶质可以快速吸收到细胞内,帮助细胞在最短时间内达到细胞内外渗透压平衡,显著降低盐份渗透胁迫对 DLL-1 细胞的毒害等不良影响。培养基营养丰富程度、接种量大小对 DLL-1 的盐份适应性影响很大,究其原因,丰富的培养基中含有很多相容性溶质或相容性溶质合成前体如甜菜碱、游离氨基酸等,而大接种量具有“群体优势”,同时死亡细胞释放的细胞内容物可以为未死亡的细胞提供相容性溶质。

鉴于甜菜碱良好的抗渗透胁迫效果,可以考虑在微生物接种剂中添加适量的甜菜碱,或者通过基因工程或代谢工程,将更高效的甜菜碱合成基因克隆到目标菌株,提高其细胞内甜菜碱合成基因和酶系的效率,从而提高接种剂适应环境的能力。

参 考 文 献

- [1] 王颖群, 陶 涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质. 微生物学通报, 1994, 21(5): 293-296.
- [2] Antonio Ventosa, Joaquín JN, Aharon O. Biology of moderately halophilic Aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2): 504-544.
- [3] Anne C, Vianney P, Jean AP, et al. Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine Betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3304-3311.
- [4] Eric B, Magne Ø, Marie CP, et al. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2072-2077.
- [5] Nagata S. Growth of *Escherichia coli* ATCC 9637 through the uptake of compatible solutes at high osmolarity. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92: 324-329.
- [6] Shinichi N, Yoriko M, Tomohiko I, et al. Effect of compatible solutes on the respiratory activity and growth of *Escherichia coli* K-12 under NaCl stress. *Journal of Biosci and Bioeng*, 2002, 94(5): 384-389.
- [7] 葛世超, 王 磊, 李小红, 等. 苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关基因 *rstA* 在大肠杆菌中的高效表达及其产物的纯化. 微生物学报, 2005, 45(3): 455-458.
- [8] 卢伟东, 赵百锁, 冯德芹, 等. 喜盐芽孢杆菌 D8 基因文库的构建及甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的筛选. 微生物学报, 2005, 45(3): 451-454.
- [9] 刘瑞杰, 陈 婷, 曹军卫. 渗透压调节基因 *proBA* 的融合表达对大肠杆菌耐高渗透胁迫能力的影响. 微生物学报, 2005, 45(1): 23-26.
- [10] 刘瑞杰, 曹军卫, 苗丽霞. 枯草芽孢杆菌耐盐突变株 *proA* 基因克隆及 *proBA* 基因渗透压调节功能研究. 微生物学报, 2004, 44(4): 452-456.
- [11] 洪 青, 何 健, 刘 智, 等. 中度嗜盐细菌 *Halomonas* sp. BYS-1 甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆和表达. 微生物学报, 2004, 44(1): 72-74.
- [12] Timmis KN. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 779-781.
- [13] Manzanera M, García de Castro A, Tøndervik A. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4328-4333.
- [14] 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.
- [15] Grieve CM, Grattan SR. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 1983, 70: 303-307.
- [16] 任媛媛, 刘景芳, 戴秀玉, 等. 海藻糖代谢途径相关基因及生物工程. 微生物学报, 2003, 43(6): 821-825.
- [17] 葛 宇, 袁勤生. 海藻糖定量分析方法比较. 药物生物技术, 2001, 8(6): 348-351.

Glycine betaine supplied exogenously enhance salinity tolerance
of *Pseudomonas putida* DLL-1

HE Jian,JIANG Jian-dong,JIA Kai-zhi,HUANG Xing,LI Shun-peng*

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department,
College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The salinity tolerance characteristic of *Pseudomonas putida* DLL-1 and the environmental factors affecting the salinity tolerance of DLL-1 were investigated. The result showed that the enrichment of culture medium influenced the salt tolerance of DLL-1, in complete medium DLL-1 could survive higher salinities than in chemically defined medium. When inoculated to complete medium with 1mol/L NaCl, the least initial biomass guarantee DLL-1 surviving was 1/100(V/V) of the medium volumes. But when inoculated to chemically defined medium with 1mol/L NaCl, the least initial biomass guarantee DLL-1 surviving was 1/10(V/V) of the medium volumes. The effects of glycine betaine exogenously supplied on the salinity tolerance of DLL-1 and its osmoprotection mechanisms were also studied. The results indicated that the glycine betaine present externally could promote the growth of DLL-1 under high salinity. 10mg/L of exogenous glycine betaine was sufficient to promote the growth condition of DLL-1 cells under high salinities. 150mg/L glycine betaine could support DLL-1 cells grow in chemically defined medium with 1.2mol/L NaCl. The presence of glycine betaine in chemically defined medium could reduce significantly the lag time and generation time and increase the final biomass of DLL-1 under salt stress. Compared with the control without exogenous glycine betaine, the lag time of the treatment with exogenous glycine betaine could be reduced from 24h to 6h, and the generation time from 60min to 35.7min, the final OD_{610} value of culture increased from 1.29 to 1.57. Under osmotic stress, DLL-1 cells could synthesis glycine betaine, trehalose and free amino acid as the main compatible solute. When exogenously supplied, DLL-1 cells accumulated exogenous glycine betaine rapidly from medium to balance the extracellular osmolality instead of the synthesis of compatible solutes.

Keywords: Exogenous glycine betaine; Osmotic protection; Salinity tolerance; *Pseudomonas putida* DLL-1

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241150); Key Programs for Science and Technology of Jiangsu Province (BE2003343)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396314; E-mail: jsp@njau.edu.cn

Received: 9 May 2005/Accepted: 6 July 2005/Revised: 12 November 2005

科学出版社生命科学编辑部新书推介

《分子生物学实验室工作手册》At the Bench: A Laboratory Navigator

〔美〕K. 巴克 著 汪维荣, 黄伟达, 等译;

科学出版社 2005 年 9 月出版 ISBN 7-03-015277-8 定价 48.00 元

本书全面论述分子生物学实验室工作, 内容涵盖实验室机构运作、软硬件配置以及实验操作过程、结果记录、数据提呈等方面, 是实验室工作的指导性手册。为加强实验室的建设与管理, 帮助实验室人员独立熟悉工作环境, 更好地完成对实验室工作信息的收集、整理、统计与交流等方面发挥积极的作用。

本书翻译忠实于原文, 最大限度地反映了原书的风格与韵味。可作为高等院校高年级学生、研究生、实验室管理者以及分子生物学实验室工作人员的参考用书。院校相关专业的本科生、研究生与教师阅读、参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社, 联系人 阮芯 联系电话 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目, 010-64012501