

甲烷古菌群感效应信号分子的检测

郭晓鹏, 张桂山, 刘晓黎, 马凯, 东秀珠*

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要:竹节状甲烷鬃菌(*Methanosaeta harundinacea*) 6Ac 是本实验室分离自厌氧颗粒污泥中的甲烷古菌新种。该菌具有短杆(3 μm - 5 μm)和长链状(>200 μm)两种细胞形态,且与细胞密度相关,暗示该菌可能存在群感效应调控的细胞形态变化。【目的】验证该菌存在群感效应信号分子并与细胞形态变化相关。【方法】用高丝氨酸内酯指示菌 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 检测菌株 6Ac 的培养液,并用购买的高丝氨酸内酯标准品加入短杆菌株 6Ac 检测形态变化。【结果】菌株 6Ac 的培养液中含有高丝氨酸内酯类物质。实验证明化学合成的高丝氨酸内酯 *N*-(β -酮基)辛酰高丝氨酸内酯能够促进竹节状甲烷鬃菌的长链细胞形成。而且在马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)、热自养甲烷杆菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus*)和甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*)的培养液中也检测到了高丝氨酸内酯。【结论】多种甲烷古菌可以产生高丝氨酸内酯类物质,并可能以此类物质作为群感效应的信号分子。

关键词: 甲烷古菌, 群感效应, 高丝氨酸内酯

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1200-05

群感效应(Quorum sensing, QS)是细菌根据种群密度大小进行种内或种间信息交流而调控群体行为的基因调控机制。QS 系统通过调控相应基因表达而调节细菌的多种生理生态功能,包括抗生素产生、生物发光、致病基因的表达、色素产生、生物膜形成等^[1]。但至今尚不知群体感应是否在古菌中存在,目前仅在隐藏嗜盐碱球菌(*Natronococcus occultus*)中检测到高丝氨酸内酯类物质^[2]。

已知革兰氏阳性细菌普遍使用短肽作为群感效应的信号分子,并通过双组份信号系统实现基因的调控。通常信号分子寡肽的前体在胞内合成,经加工修饰后由 ABC 转运系统转运至胞外;当其在胞外的浓度达到一定阈值时,则通过与双组份系统中的膜受体组氨酸激酶结合并使之自身磷酸化,之后再

将磷酸基团传递给应答转录调控蛋白,从而激活其活性后开启或关闭下游一系列基因的转录^[3]。而革兰氏阴性菌则使用高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)为群感效应信号分子。最早被阐明的是发光细菌费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)的 LuxI/R 系统,该系统的 LuxI 蛋白合成 *N*-(3-氧-己酰)高丝氨酸内酯(OHHL),后者通过与转录激活因子 LuxR 结合后激活 *Vibrio fischeri* 的 lux 操纵子^[4]。研究表明,还存在其它群体感应信号分子,如 *Pseudomonas aeruginosa* 的环啉诺酮和二酮哌嗪, *Ralstonia solanacearum* 的脂肪酰甲酯^[5]。

竹节状甲烷鬃菌(*Methanosaeta harundinacea*)是本实验室分离自清华大学环境科学与工程系的啤酒废水 UASB 反应器的一个新的甲烷古菌^[6],并已

基金项目: 国家自然科学基金(30830007, 30621005)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807413; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

作者简介: 郭晓鹏(1985-),女,河南人,硕士研究生,主要从事甲烷古菌群感效应的研究。E-mail: guoxiaop@gmail.com

收稿日期: 2011-04-01; **修回日期:** 2011-04-29

完成了其基因组的序列分析。甲烷鬃菌是一类只利用乙酸产甲烷的甲烷菌类群,而且它们是环境中主要的乙酸型甲烷菌,同时是污水处理器中重要的功能菌。在厌氧反应器及自然环境中,甲烷鬃菌的细胞通常为长丝状,并有助于颗粒污泥的结构形成和维持^[7]。

本研究发现竹节状甲烷鬃菌存在短杆和长链两种细胞形态,而细胞形态的变化与细胞密度直接相关,暗示存在着群感效应调控细胞形态的可能。本研究检测了该菌及其他甲烷古菌可能的群感效应信号分子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:高丝氨酸内酯标准品 *N*-Capryloyl-DL-homoserine lactone (227.3 kDa), Caproyl-DL-homoserine lactone (199.25 kDa), *N*-Lauroyl-DL-homoserine lactone (283.41 kDa), *N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone (241.28 kDa), Heptanoyl-DL-homoserine lactone (213.27 kDa) 及 *N*-(β -Ketocaproyl)-DL-homoserine lactone (213.23 kDa) 均购买于 United States Sigma-Aldrich 公司; β -半乳糖苷酶试剂盒购买于威格拉斯(北京)生物技术有限公司; X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), 硫酸庆大霉素 (gentamycin sulfate), 色谱纯乙酸乙酯, 色谱纯甲醇等购自于德国 Merck 中国公司。

1.1.2 菌株: *Methanosaeta harundinacea* 6Ac 为本实验室分离和保存; *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 由 University of California at Los Angeles 的施文元教授惠赠; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Methanobacterium formicicum* JF1, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* delta H, *Methanosarcina mazei* Go1 来自德国微生物菌种保藏中心。

1.2 无细胞培养液的制备

甲烷菌基础培养基成分参见 McInerney (1979) 的方法^[8]。将培养至对数中期的甲烷菌培养液用 0.22 μ m 滤膜过滤至厌氧管中。

1.2.2 指示菌检测高丝氨酸内酯: 将高丝氨酸内酯指示菌株 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 在 AB 培养基^[9] (含 30 μ g/mL 的庆大霉素) 28 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养, 然后与融化的 AB 固体培养基在 45 $^{\circ}$ C 以 2:1 的

比例混合 (含 40 μ g/mL 的 X-gal, 30 μ g/mL 的庆大霉素)。待培养基凝固后打孔, 将待测样品 2 μ L 注入孔中, 在 28 $^{\circ}$ C 培养 24 - 48 h 后, 如果样孔周围出现蓝色则指示样品中含高丝氨酸内酯^[9]。

1.2.3 高丝氨酸内酯的定量检测: 在 1 mL OD_{600} 约为 0.4 的 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 菌液中加入待测样品, 在 28 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 之后裂解细胞并取裂解液 80 μ L (约含 0.1 mg 蛋白质), 加入邻硝基苯 β -D-吡喃半乳糖 (ONPG) 底物溶液 80 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后测定 430 nm 下的吸光度。以高丝氨酸内酯标品 (*N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone) 绘制 AHLs 含量检测标准定量曲线。将标品梯度稀释后加入 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, 孵育后定量检测 430 nm 下吸光度并绘制标准曲线^[10]。

2 结果

2.1 细胞密度影响细胞形态变化

竹节状甲烷鬃菌存在着长链短链的形态变化现象, 当消耗低浓度的乙酸 (50 mmol/L) 时细胞为短杆状 (3 - 5 μ m) (图 1-A), 而消耗高浓度的乙酸 (\geq 150 mmol/L) 培养物呈长链状 (> 200 μ m) (图 1-B)。短杆细胞的培养液呈均匀浑浊状态 (图 1-C), 而长链细胞培养液出现絮凝现象 (图 1-D)。而

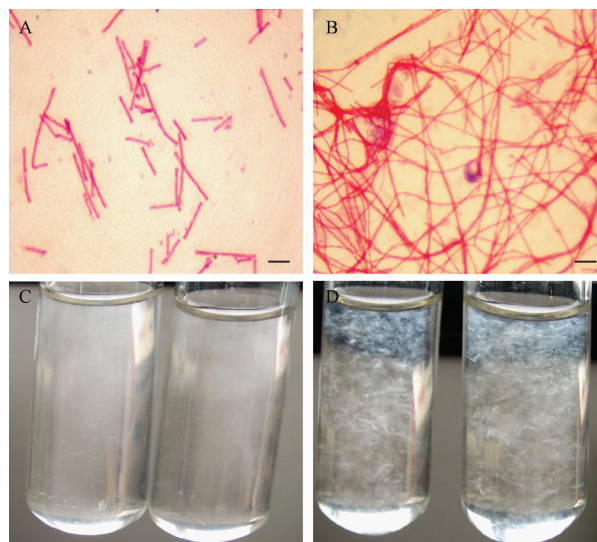


图 1 竹节状甲烷鬃菌 (*Methanosaeta harundinacea*) 6Ac 两种细胞形态及培养液外观

Fig. 1 Micrographs of *Methanosaeta harundinacea* and appearances of the cultures. A: short cells; B: filamentous cells; C: appearance of the short cell culture; D: appearance of the filamentous cells culture. Bar: 5 μ m.

且消耗的乙酸浓度越高,长链细胞形成越明显。荧光显微镜(Zeiss ImagerA1)观测显示长链状细胞是由同一外壳包裹的多个细胞组成(图2)。

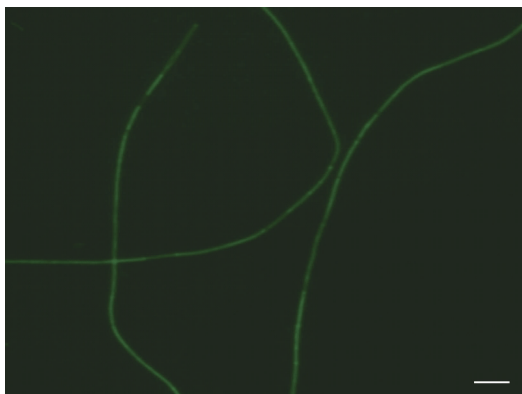


图2 竹节状甲烷鬃菌长链细胞的荧光显微照片(激发光波长420 nm)

Fig. 2 Fluorescence microscopic image of the filamentous cells of *Methanoseta harundinacea* under 420 nm, Bar: 5 μm .

为了验证是乙酸浓度还是细胞密度引起细胞形态变化,我们对起始乙酸浓度为50 mmol/L的15 d培养物(短杆状细胞,残留乙酸浓度23 mmol/L)在厌氧箱中2000 r/min低速离心后,将培养物浓缩4倍,但乙酸浓度保持不变。继续培养10 d后,浓缩试管中的短杆细胞形成长链状,呈絮凝状外观,而未浓缩的细胞仍呈短杆状,呈均匀浑浊状外观。说明细胞形态的转变和乙酸浓度无直接关系,而和细胞密度直接相关。

2.2 长链细胞培养液促进细胞由短杆转变为长链

为了证明是细胞培养液中的某种物质促进细胞形态的变化,我们以竹节状甲烷鬃菌长链细胞培养液与水,按终浓度体积比配50 mmol/L乙酸的培养基。接种竹节状甲烷鬃菌6Ac后培养。与对照相比,含有长链细胞培养液的培养基促进细胞提前10 d由短杆变成长链。加入的长链细胞培养液比例越高,长链细胞的比例越高,而且链也越长(图3)。

2.3 竹节状甲烷鬃菌细胞培养液中存在高丝氨酸内酯类物质

我们用QS系统I型信号分子报告菌根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4检测竹节状甲烷鬃菌培养液上清中是否含有高丝氨酸内酯,并用*Pseudomonas aeruginosa*的16-24 h培养液和高丝氨酸内酯标准品 *N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone 作为阳性对照,空白培养基作为阴性对照。

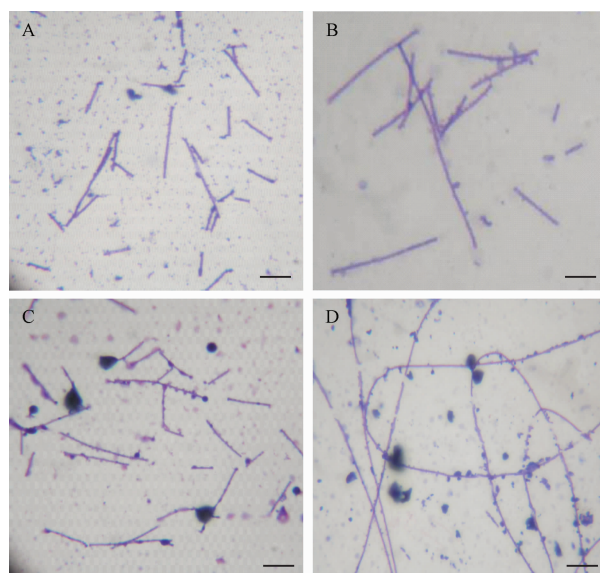


图3 在含长链细胞培养液的培养基中培养的竹节状甲烷鬃菌细胞形态

Fig. 3 Microscopic images of the filaments in conditioned medium with various ratio of the spent culture of filamentous cells. A: none; B: 25% spent culture of filamentous cells; C: 50% spent culture of filamentous cells; D: 100% spent culture of filamentous cells. Bar: 5 μm .

和阳性对照相同,指示平皿上竹节状甲烷鬃菌6Ac的培养液孔周围出现蓝色,而培养基阴性对照未出现蓝色,说明6Ac的培养上清中存在高丝氨酸内酯类AHLs物质(图4)。

为了定量检测甲烷鬃菌产生的高丝氨酸内酯,我们用QS系统I型信号分子报告菌根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4指示菌结合邻硝基苯 β -D-吡喃半乳糖(ONPG)方法,并以高丝氨酸内酯标准品(*N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone)制备AHLs标准曲线。测定结果表明,长链细胞和短杆细胞培养液中分别含有高丝氨酸内酯 $27.01 \pm 0.54 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.53 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$ 。说明长链细胞产生更多的高丝氨酸内酯物质。

2.4 高丝氨酸内酯可能是竹节状甲烷鬃菌的群感效应信号分子

为了验证竹节状甲烷鬃菌是否使用高丝氨酸内酯作为群感效应的信号分子,我们将化学合成的6种高丝氨酸内酯加入其对数生长期的50 mmol/L乙酸的培养物中。结果显示在加入 *N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone (241.28 kDa)的培养物中,相对于未加信号分子的短杆细胞,>20%的细胞成为长链状细胞,初步表明高丝氨酸内酯是

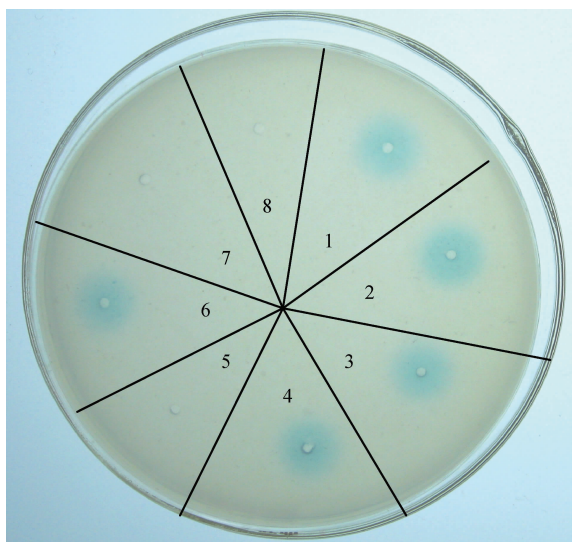


图4 根癌农杆菌 NTL4 检测竹节状甲烷鬃菌 6Ac 培养液中的高丝氨酸内酯

Fig. 4 Detection of AHLs in the cultures of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac using reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. 1: 1500-fold concentrated filamentous cells spent culture of *Methanosaeta harundinacea*; 2: 1500-fold concentrated short rods spent culture of *Methanosaeta harundinacea*; 3: 300-fold concentrated spent culture of *Pseudomonas aeruginosa*; 4: the cell free extract of *Methanosaeta harundinacea*; 5: 1500-fold concentrated medium; 6: chemical synthetic *N*-(β -Keto-octanoyl)-L-homoserine lactone; 7: 50% methanol; 8: blank.

竹节状甲烷鬃菌可能的群感效应信号分子。

2.5 甲烷菌普遍产生高丝氨酸内酯

我们将甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*)、热自养甲烷杆菌 (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*) 和马氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina mazei*) 培养至对数生长后期,之后从培养液中萃取可能的高丝氨酸内酯物质。结果用指示菌方法检测到 3 种甲烷菌的培养液中均含有高丝氨酸内酯物质(图 5)。定量分析显示,马氏八叠甲烷球菌培养液含 $17.70 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ 高丝氨酸内酯物质; 甲酸甲烷杆菌培养液含 $7.40 \pm 0.36 \mu\text{mol/L}$ 高丝氨酸内酯物质,热自养甲烷杆菌培养液含 $3.26 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ 高丝氨酸内酯物质。说明和甲烷鬃菌近缘的甲烷八叠球菌产生更高水平的高丝氨酸内酯物质。

3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来,人们发现细菌中普遍

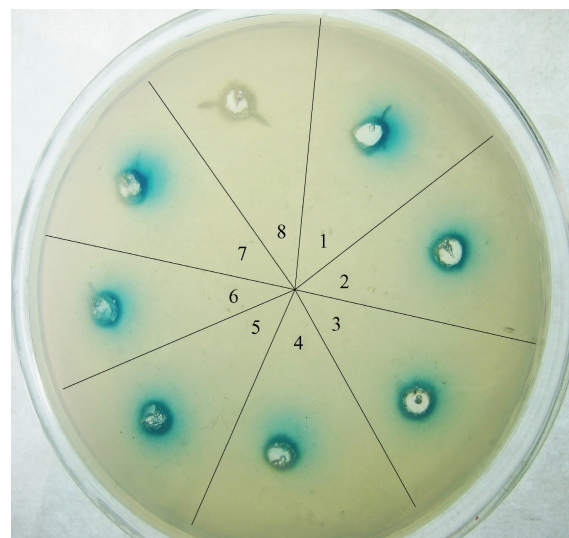


图5 用根癌农杆菌 NTL4 检测其他甲烷菌培养液中的高丝氨酸内酯

Fig. 5 Detection of AHLs in the cultures of methanogens by *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. 1: *N*-(β -Keto-octanoyl)-L-homoserine lactone; 2: 1500-fold concentrated short rods spent culture of *Methanosaeta harundinacea*; 3: 1500-fold concentrated filamentous cell spent culture of *Methanosaeta harundinacea*; 4: 500-fold concentrated spent culture of *Methanothermobacter thermoautotrophicus*; 5: 500-fold concentrated spent culture of *Methanosarcina mazei*; 6: 500-fold concentrated spent culture of *Methanobacterium formicicum*; 7: 500-fold concentrated spent culture of *Pseudomonas aeruginosa*; 8: 500-fold concentrated medium.

存在群感效应调控的基因表达机制。本研究报道了甲烷鬃菌产生高丝氨酸内酯类物质,并且可能利用这类酯类物质作为群感效应的信号分子。同时在其他 3 种甲烷古菌中也检测到高丝氨酸内酯。我们用细菌的 *luxI* 同源基因作为探针,在竹节状甲烷鬃菌的基因组中找到了同源基因(暂命名为 *filI*),而且与 *filI* 相邻的基因(*filR*)与 *luxR* 具有同源性。这表明部分甲烷古菌可能使用革兰氏阴性细菌的群感效应信号分子及其调控系统。在甲烷古菌中发现群感效应现象说明该基因调控机制在原核生物中普遍存在,并提供了研究群体行为调控机制进化的材料。

甲烷鬃菌被认为是厌氧降解反应器中重要的功能类群,这不仅是因为它们转化乙酸产甲烷的功能,而且其长链状细胞通过“脚手架”样的功能将其他功能类群的微生物固定在一起,对形成和稳定活性颗粒污泥具有重要作用。因此,认识甲烷鬃菌的群感效应对促进颗粒污泥形成,提高厌氧反应器的转化效率具有指导作用。

参考文献

- [1] Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 2007, 153: 3923-3938.
- [2] Paggi R, Celina BM, Clay F, Rosana EC. Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2003, 221(1): 49-52.
- [3] Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *staphylococcal* virulence. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(6):1429-1449.
- [4] Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(16): 8789-8793.
- [5] Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, 2007, 24(3): 555- 566.
- [6] Ma K, Liu XL, Dong XZ. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(1): 127-131.
- [7] Macleod FA, Guiot SR, Costerton JW. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1598-1607.
- [8] McInerney MJ, Bryant MP, Pfennig N. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Archives of Microbiology*, 1979, 122(2): 129-135.
- [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 autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6949-6953.
- [10] Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(11):1119-1129.

Detection of the quorum sensing signals in methanogenic Archaea

Xiaopeng Guo, Guishan Zhang, Xiaoli Liu, Kai Ma, Xiuzhu Dong*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Methanosaeta harundinacea* 6Ac displayed a cell-density dependent cell morphology transition between short rods (3 μm – 5 μm) and filaments (>200 μm), implying a quorum sensing system in this archaeon. [**Objective**] This study aimed to confirm that cell morphology related quorum sensing exists in *Methanosaeta harundinacea*. [**Methods**] By using the bioassay of *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, we determined the presence of acyl homoserine lactones (AHLs) in the spent cultures of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac and other three methanogens. A chemical synthetic AHL, *N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone was added into the culture of short rods to detect the morphology change. [**Results**] We determined that AHLs were produced by *Methanosaeta harundinacea*, *Methanosarcina mazei*, *Methanothermobacter thermautotrophicus* and *Methanobacterium formicicum*. Addition of *N*-(β -Ketoctanoyl)-L-homoserine lactone into the culture of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac stimulated the formation of filamentous cells. [**Conclusion**] This study indicates that AHL-based quorum sensing may be used by several species of methanogenic *Archaea*.

Keywords: methanogenic Archaea, quorum sensing, *N*-acyl-homoserine lactones

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Science Foundation(30830007, 30621005)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807413;E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

Received :1 April 2011/Revised: 29 April 2011