

发光酶基因标记荧光假单胞菌 X16L2 的发光研究*

王 平 王 绩 胡正嘉 李阜棣

(华中农业大学农业微生物农业部重点实验室, 武汉 430070)

摘 要 通过发光光度仪和 AMPN 法定量测定荧光假单胞菌 X16L2 (*Pseudomonas fluorescens* X16L2, 简称 X16L2) 在液培和土壤中的发光情况及其数量, 发现 X16L2 在液培和土壤中的发光动力学曲线相似, 达到稳定发光强度的时间均在加入反应底物癸醛后约 7 分钟。X16L2 在液培中的发光强度与生物量呈正相关。土壤中 X16L2 的发光量既与活菌数有关, 也与土壤条件有关。土著微生物对 X16L2 的发光量、发光潜势和存活性有很大影响。本项研究表明, 在一般情况下发光强度定量法既可对样品中标记微生物的生理活性进行原位快速测定, 又可对其群体数量进行间接定量。这种方法具有选择性强、灵敏度高、稳定而又经济的优点, 对于跟踪和回收释放至环境中的靶细菌具有重要的应用价值。

关键词 荧光假单胞菌, 发光检测, 液体培养, 土壤微宇宙

中图分类号 S154.3

有益遗传修饰微生物 (Genetically Modified Microorganisms, 简称 GMMs) 的释放能更好地促进作物生长、生物固氮、污染物的生物降解及病虫害的生物防治。但在其大规模释放以前, 根据有关规定^[1], 必须对其进行严格的风险评估 (risk assessment) 即生物安全性评价, 以避免可能引起的生态性灾难。而要进行此类评价, 必须突破传统方法的限制, 将靶细菌 (即 GMMs) 与环境中的同类土著细菌分开, 才能达到特异性检测的要求^[2]。近年来, 随着微生物分子生态学的诞生与发展、跟踪引入自然环境中的微生物的遗传标记系统的不断建立, 人们评估释放 GMMs 安全性的能力也大大提高。在许多应用于跟踪检测 GMMs 的方法中^[3,4], 以生物发光为基础的检测技术已引起了人们的广泛兴趣。如采用发光酶基因 (Lux) 跟踪植物体内的病原菌, 检测豆科植物根瘤中的根瘤菌, 测量定殖在作物根圈的促生细菌, 以及回收引入土壤中的各种细菌^[5,6], 其主要优点是发光酶基因在土壤微生物中无背景干扰, 选择性强, 检测方法多样。

本文报道的是采用 AMPN (Alternative most-probable-number) 法和发光光度计测量法 (Luminometry) 研究液体培养和土壤微宇宙 (Soil microcosm) 中小麦促长根圈细菌

* 国家自然科学基金 (批准号: 39570028) 和国际科学基金 (批准号: C/2362-1) 资助项目; 湖北省自然科学基金 (批准号: 95J14)

收稿日期: 1997-05-30; 收到修改稿日期: 1997-12-05

(Plant growth-promoting rhizobacteria, 简称 PGPR) — 荧光假单胞 (*Pseudomonas fluorescens*) X16 的细菌荧光酶基因 (LuxAB) 标记菌株 Pf. X16L2 的发光强度和群体数量及其相互关系。这项工作也是为今后进一步开展根圈微生物分子生态学的研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

供试菌株: *Pseudomonas fluorescens* X16L2(本文中简称 X16L2), 为携有 Tn5-lux AB 标记系统的荧光假单胞菌 Pf. X16, 本文作者提供^[7]; 培养基: KB 培养基^[8], 523 培养液^[9]; 抗生素: 卡那霉素 (Km), 100 μ g / ml, 链霉素 (Str), 50 μ g / ml; 供试土壤: 供试土壤及其基本农化性状和机械组成分别见表 1 和表 2。

表 1 土壤的基本农化性状¹⁾

Table 1 Some basic properties of the soils used

土壤类型 Soil type	有机质 Organic matter (%)	碱解氮 Available N	速效磷 Available P (mg/ kg)	速效钾 Available K	pH	田间持水量 Field water capacity (%)	土壤含水量 Soil water content (%)
灰潮土	1.26	31.15	10.71	55.2	8.43	34.22	0.95
黄棕壤	1.46	73.25	23.26	99.4	6.61	38.76	2.65

1) 测定方法参见文献[10]

表 2 土壤的机械组成 (%)

Table 2 Mechanical composition of the soils (%)

土壤名称 Soil type	>0.22	0.22—0.05	0.05—0.02	0.02—0.002	<0.002	质地 ¹⁾ Texture
	(mm)					
灰潮土	0.26	0.59	69.35	14.03	15.77	砂质壤土
黄棕壤	1.94	3.26	22.41	3.50	68.89	粘土

1) 根据美国质地分类制确定^[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 AMPN 法^[11] 检测发光菌落时, 在培养皿盖内加入 1% 癸醛 5 μ l, 入暗室观察。菌落发光视为阳性。根据所得数量指标查“MPN 法 5 次重复测数统计表”, 再按 MPN 结果换算方法将所得数据换算为菌落形成单位 (Colony Forming Unit, 简称 CFU, 即一定体积或重量的样品能够在检测平板上形成的待测菌落数)。

1.2.2 X16L2 发光动力学曲线的测定 液培中 X16L2 发光动力学曲线的测定: 取 10 μ l X16L2 新鲜培养液于 5ml KB 培养液中, 28 $^{\circ}$ C 150rpm 摇床培养 2 小时, 以无菌 0.1% MgSO₄ · 7H₂O 作 10 倍稀释; 取合适稀释度之菌液 1ml 于测试管内, 加入 20% 癸醛 5 μ l, 上机 (LKB 1251 luminometry system, Pharmacia Ltd.) 即刻开始测定发光强度。每隔 5 分钟测定 1 次, 如此连续测定, 直至读数不再改变为止。测定条件: 温度 25 $^{\circ}$ C, 连续搅拌, 每积分 10 秒读一次数, 连续 3 次, 取其平均值作为发光强度。以无菌 0.1% MgSO₄ · 7H₂O 溶液为对照。表示单位: 发光度 Luminescence (mV / ml)。

土壤中 X16L2 发光动力学曲线的测定: 分别取灰潮土和黄棕壤各 5g 于 20ml 带盖玻璃瓶中, 加入

1.0ml 合适稀释度之菌液于瓶内,与土充分混匀,构成2种不同的土壤微宇宙。称取0.5g含菌土于测试管中,加入无菌0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0ml及20%癸醛5 μ l于试管中,上机即刻开始测定发光强度,测定条件同上。以不加菌液但加有0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0ml的土壤悬液为对照。表示单位:发光度 Luminescence(mV / g 土)。

1.2.3 X16L2 发光强度检出下限的测定 液培中 X16L2 检出下限的测定: 取前述摇床培养液之系列稀释液各1ml于测试管中,加入20%癸醛5 μ l于测试管内,4分钟后上机测定发光强度。对照处理和测定条件同上。测定结束后,即刻以AMPN法测定发光度数其明显大于对照的稀释液中的发光细菌数。

土壤中 X16L2 检出下限的测定: 取前述 X16L2 之系列稀释液各1ml分别加入盛有5g土的20ml带盖玻璃瓶中,充分混匀,构成土壤微宇宙。然后,从瓶中称取0.5g含菌土于测试管中,加入0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0ml及20%癸醛5 μ l于测试管中,4分钟后上机开始测定发光强度,对照处理和测定条件同上。测定结束后,即刻以AMPN法测定发光强度读数其显著高于对照的土壤中的发光细菌数。

1.2.4 液培中 X16L2 发光强度与生物量关系的测定 取一环 X16L2 之斜面菌苔接入盛有100ml KB 培养液的250ml三角瓶中,28 $^{\circ}C$ 摇床培养(200rpm)一夜。取50 μ l该培养物接入盛有5ml KB 培养液 PA 瓶中(共36瓶),28 $^{\circ}C$,200rpm摇床培养,然后每小时取样一次,每次取出3瓶,测定发光强度和600nm波长处细胞光密度(OD600,721型分光光度计)。

(1) 发光潜势的测定: 在接种了上述 10^{-2} 稀释菌液且放置过夜的2种土壤微宇宙中,分别称取0.5g土样于测试管内,再加入1ml含有10mg/ml柠檬酸钠的 2×523 培养基,28 $^{\circ}C$,200rpm摇床培养。自开始培养时取样,每隔20分钟1次,共7次。每次从2种微宇宙中分别取出3瓶测发光强度。

(2) X16L2 在不同存放期微宇宙中发光强度与活菌数的测定: 为测定贮存时间对土壤微宇宙中 X16L2 的存活及发光强度的影响,将前述 10^{-1} 稀释度菌液接入2种土壤微宇宙中。将微宇宙置于28 $^{\circ}C$ 存放,每隔7天从2种微宇宙中各取出3瓶测发光强度和活菌数,取样共计7次。

2 结果与分析

2.1 X16L2 的发光动力学曲线

选取 10^{-4} 稀释度菌悬液和 10^{-1} 菌悬液接种土壤,测定 Pf.X16L2 在加入发光酶的反应底物——癸醛后,在不同时间的发光强度。测定结果如图1所示。从图1可以看出,在加入底物后,X16L2 不论是在菌悬液中还是在土壤中,7分钟后,其发光强度均已达到稳定水平。因此,为节约测定时间,可在加入底物后4分钟上机,待第1支测试管到达测定位置时,刚好7分钟,这时开始读数,即可读取较为稳定的发光值。但土壤类型对最大发光强度有很大影响,如 X16L2 在黄棕壤(粘土)中的最大发光强度显著小于灰潮土(沙土)中的。引起这种差异的直接原因是2种土壤中 X16L2 的数量不同(灰潮土: 2.2×10^6 CFU / g,黄棕壤: 7.0×10^4 CFU / g)。而接种量

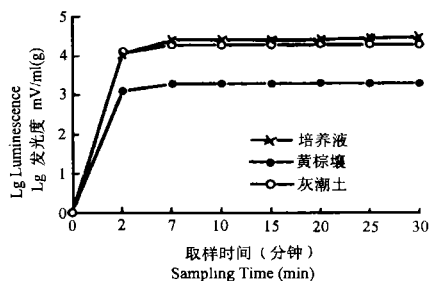


图1 X16L2 在液培和土壤中的发光动力学曲线

Fig.1 Bioluminescence kinetic curves of X16L2 in the liquid culture and soils

原本相同的 2 种土壤中,其含菌量何以发生了这样大的变化,究竟是酸度的影响,还是质地的作用? 尚待进一步研究。

2.2 X16L2 发光强度的检出下限

通过测定不同稀释度菌悬液及其接种土壤中 X16L2 的发光强度,结合 AMPN 发光菌落计数(图 2)和统计检验,可以确定 X16L2 在菌悬液和土壤中发光强度的最低检出限。检测与统计分析结果见表 3。

表 3 菌悬液与土壤中 X16L2 发光强度的检出下限

Table 3 The detection limit of luminous intensity of X16L2 in the dilute suspension and soils

样品 Sample	含菌数 Number of cells CFU/(ml·g)	平均值 Mean L/(ml·g)	变异范围 Variation range (CV%)	t 值 t value	$t_{0.01}$
0.1% MgSO ₄ ·7H ₂ O		5.388	2.04		4.604
10 ⁻⁹ 菌悬液		5.480	0.34	1.46	
10 ⁻⁸ 菌悬液	5	8.198	4.05	13.91**	
灰潮土+0.1% MgSO ₄		5.848	1.99		
+10 ⁻⁶ 菌悬液	22	5.976	3.30	0.97	
+10 ⁻⁵ 菌悬液	220	7.018	1.61	12.50**	
黄棕壤+0.1% MgSO ₄		5.986	1.40		
+10 ⁻⁵ 菌悬液	7	6.168	1.87	2.20	
+10 ⁻⁴ 菌悬液	70	7.882	4.30	9.17**	

1) 指发光度对数值之平均值

从表 3 可知,菌悬液中 X16L2 的检出下限为 5CFU/ml,黄棕壤和灰潮土中的检出下限分别为 70 和 220CFU·g⁻¹土。2 种土壤中检出下限的差别暗示土壤条件(如酸度和质地)对 X16L2 的发光活性具有一定的影响。将各级稀释液及其所接种土壤的发光强度测定值减去各自的对照发光测定值(本底值)后,取以 10 为底的对数得 lgL,再将其与含菌量(CFU)的对数值 lgCFU 作图,并计算回归方程。菌悬液、黄棕壤和灰潮土的分别为: lgCFU = 1.0263lg L + 0.6103, ($r = 0.9923^{**}$, $r_{0.01} = 0.917$); lgCFU = 0.9541lg L + 1.5565, ($r = 0.997^{**}$, $r_{0.01} = 0.99$); lgCFU = 1.0501lg L + 2.2339, ($r = 0.9958^{**}$, $r_{0.01} = 0.959$)。

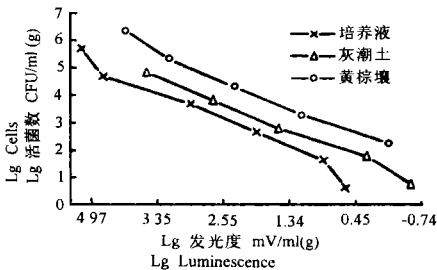


图 2 X16L2 发光强度与群体数量的相互关系

Fig.2 Relationship between the luminescence and viable cell number of X16L2 in the samples

图 2 表明发光强度与样品含菌量之间存在显著的线性关系。根据回归方程和外推法,还可计算出 3 种样品中发光标记细菌在理论上的最低检出限,如菌悬液、黄棕壤和灰潮土中标记菌株数量的最低检出限分别为 4、36 和 171CFU/ml(g),检测出的发光度均有效。

此外,X16L2 在土壤中的检测灵敏度较之菌悬液中的低 1~2 个数量级,其原因主要与土壤颗粒对光子的遮盖和对发光菌细胞的吸附导致发光消失有关。而检测灵敏度在 2 种土壤中的差异高达 1 个数量级,可能与土壤酸度和机械组成有关。土壤颗粒越小(如粘粒),对光子的遮盖作用会越小。此外,过高的 pH 值也可能影响标记菌株的发光活性。

2.3 液体培养中 Pf.X16L2 发光强度与生物量的关系

采用批量培养法测定了 X16L2 的发光强度和生物量。将所测数据经 \log_{10} 转换后, 分别与测定时间(小时, h)作图(图 3)。从图 3 可以看出 X16L2 发光强度(L)的变化曲线与其生长曲线基本同步, 这表明液体培养时 X16L2 的发光强度可反映其生物量。而且据此计算出的 $\lg L$ 与 $\lg OD$ 值之间的回归方程 $\lg L = 0.971\lg OD + 6.07(r = 0.9692^{**}, r_{0.01} = 0.735)$, 也说明它们之间存在显著的线性关系。

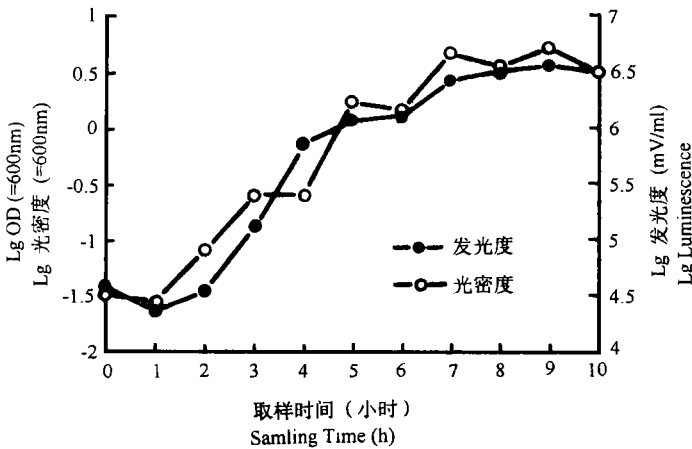


图 3 液体培养中 X16L2 发光强度与生物量(光密度)的变化曲线
Fig.3 Changes in luminescence of X16L2 with OD600 in the liquid culture

2.4 土壤微宇宙中 X16L2 的发光潜势

发光潜势(Potential luminescence)是由 Meikle 等^[12]于 1994 年提出的借以评估引入细菌在液培和土壤微宇宙中饥饿一段时间后, 经补充营养重又恢复生命活性的能力, 而这种能力的大小对于释放至环境中的遗传改良微生物的养分竞争、存活和繁殖至关重要。土壤微宇宙中 X16L2 发光潜势的测定结果如图 4 所示。2 种微宇宙中, X16L2 在复活培养 2 小时后的发光强度均趋于稳定, 这与 Meikle 等报道的结果基本一致。但 2 种微宇宙相比, 无菌土壤微宇宙中 X16L2 恢复至最强活性时所需时间为 40 分钟; 在有菌微宇宙中, 它达到最强活性的时间则为 80 分钟, 而且, 它在开始恢复活性时的发光度也远远低于无菌土壤微宇宙中的, 这种差异在随后的培养过程中变得更加明显。

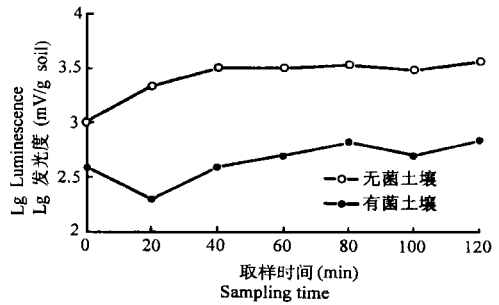


图 4 X16L2 在无菌和有菌土壤微宇宙中的发光潜势
Fig.4 Potential luminescence of X16L2 in sterile and non-sterile soil microcosms

2.5 贮存时间对土壤微宇宙中 X16L2 发光强度与活菌数的影响

从图 5 可以看出, 当贮存时间达到 49 天时, 2 种土壤微宇宙中 X16L2 的活菌数分别下

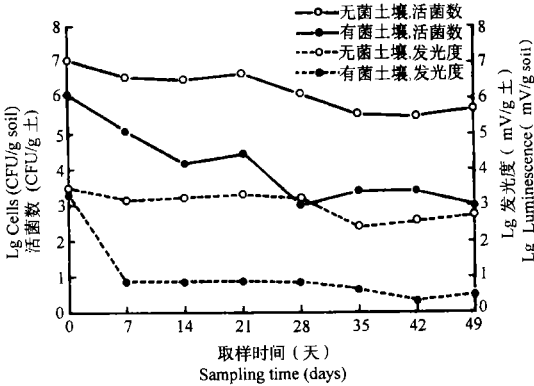


图5 存放时间对灭菌和未灭菌土壤微宇宙中 X16L2 活菌数和发光强度的影响

Fig.5 Changes in viable cell number and luminescence of X16L2 in sterile and non-sterile soil microcosms during the period of stock

降了 1.35 和 3 个对数单位;有菌土壤微宇宙中 X16L2 的发光强度在贮存时间达 7 天时即从开始存放时的 3.28 lg 单位降至 0.88 lg 单位,至 49 天时已下降到 0.51 lg 单位。而无菌土壤微宇宙中 X16L2 之发光强度减少的程度却不到一个数量级。图 5 还表明:与无菌土壤微宇宙相比,X16L2 的活菌数和发光强度不但在有菌土壤微宇宙中的下降速度快,而且在 2 种土壤微宇宙间的差别也很大。这说明在贮存过程中,土著微生物对引入菌株 X16L2 之活菌数和发光强度也有显著影响。

3 讨 论

已有许多方法用于跟踪 lux 基因标记遗传改良细菌在环境中的释放,但国际上应用得最为普遍的还是发光菌落计数、x-射线胶片自显影、CCD 照相机拍照与发光强度的测量^[13]。本项工作中,从土壤中回收 X16L2 时,只需在培养平板上加入 1% 癸醛 5μl,即可凭肉眼在暗室中检出该菌株形成的发光菌落。而且,结合 AMPN 法,理论上讲,检出下限可达 4CFU / g 土。此外,在检测释放至环境中的 GMMs 时,这种方法较之常规的选择平板法(如抗性)还具有更好的选择性。国外的大量研究结果也表明^[14,15]:采用发光光度法检测样品中微生物的群体活性并用以反映样品中该种生物的生物量和数量,较之现有的其它方法如脱氢酶活性测定法具有更多的优点:①检测方法简单快速,取样后 5 分钟内即可得出结果,而且不必进一步培养;②不需要昂贵的化学试剂;③不需从土壤中提取目标细胞,多个样品可同步检测;④更重要的是发光光度法测量的只是生物发光酶基因标记群体的活性。本项研究结果指出:发光光度法在检测样品中标记微生物的活性并反映其群体数量方面,确实具有经济、快速、稳定、选择性强的优点。而且,检测灵敏度很高,菌悬液中的检测下限可达 5CFU / ml,在黄棕壤和灰潮土中的检测下限则分别为:70 和 220CFU / g。因此,在评估包括遗传改良菌株在内的一些细菌接种物在土壤和植物根圈中的活性时,生物发光光度法仍不失为一种非常合适的方法。本项研究结果还充分证实了土壤中的土著微生物对 X16L2 的发光强度亦即细胞活性或活菌数有显著影响。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国国家科学技术委员会令(第 17 号). 基因工程安全管理办法. 1993-12-24
2. 王 平, 李阜棣. 有关细菌根部定殖测量的几个重要问题. 土壤学进展, 1994, 22(6): 35-41

3. 王 平, 李阜棣. 标记基因在根圈微生物定殖研究中的应用. 生物技术通报, 1994, 5: 9—12
4. Lindow S E. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 555—566.
5. 王 平, 胡正嘉, 李阜棣. 发光酶基因在微生物分子生态学研究中的应用. 生态学杂志, 1996, 15(3): 26—34
6. White D, Leifert C, Ryder M H et al. Lux gene technology—a strategy to optimize biological control of soil-borne disease. *New Phytologist*, 1996, 133: 173—181
7. 王 平, 胡正嘉, 李阜棣. 小麦根圈荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) X16 的发光酶基因标记. 华中农业大学学报, 1997, 16(3): 220—225
8. 中国科学院北京微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1979
9. Kado C I, Heskett, M G, Langlry R A. Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: Characterization of strains ID1 35 and B6, and analysis of the bacterial chromosome, transfer RNA and ribosome for tumor inducing ability. *Physiol. Plant Pathol.*, 1972, 2: 47—57
10. 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析. 北京: 科学出版社, 1979
11. Carvalhal M L C, Oliveria M S, Alterthum F. An economical and time saving alternative to the most-probable-number method for the enumeration of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 1991, 14: 165—170
12. Meikle A, Killham K, Prosser J I et al. Luminometric measurement of population activity of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* in the soil. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 99: 217—220
13. Prosser J I. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiology*, 1994, 140: 5—17
14. Amin-Hanjani S, Meikle A, Glover L A, et al. Plasmid and chromosomally encoded luminescence marker systems for detection of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 47—54
15. Meikle A, Glover L A, Killham K, et al. Potential luminescence as an indicator of activation of genetically-modified *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture and in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26(6): 747—755

BIOLUMINESCENCE OF LUXAB-GENES-MARKED *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* X16L2

Wang Ping Wang Ji Hu Zheng-jia Li Fu-di

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Summary

A luminescence measurement of the luxAB-genes-marked strain (*Pseudomonas fluorescens* X16L2) was carried out in liquid culture and soil microcosms. The curves of luminescence kinetics of X16L2 in the liquid culture and soils were similar. The time reaching stable luminescence was about 7 min after the luciferase substrate (n-decanal) was added. The results also showed that the bioluminescence could reflect the biomass of X16L2 in liquid culture, and the light output of X16L2 was closely related to not only the number of viable cells but also the cell physiological activity. Soil conditions and native microorganisms had great effects on the survival of the introduced strain, including the number of viable cells and light output as well as the potential luminescence of X16L2. This study also demonstrated that luminometry could not only *in situ* detect the physiological activity of lux-genes-marked strain in the samples, but also measure its population indirectly. This method was a rapid and economical technique with high stability and sensitivity, and strong selectivity for tracking and recovering target microorganisms released to the environments.

Key words *Pseudomonas fluorescens*, Luminescence measurement, Liquid culture, Soil microcosm