

ISSN 0564-3929

Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao

土壤学报

第五十二卷

第一期

二〇一五年一月

科学出版社



中国土壤学会
科学出版社

主办
出版

2015

第52卷 第1期

Vol.52 No.1

《土壤学报》编辑委员会

主 编: 史学正

执行编委: (按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任: 陈德明

责任编辑: 汪枏生 卢 萍 檀满枝

土 壤 学 报

Turang Xuebao

(双月刊, 1948 年创刊)

第 52 卷 第 1 期 2015 年 1 月

ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 1 Jan., 2015

编 辑 《土 壤 学 报》编 辑 委 员 会
地址: 南京市北京东路 71 号 邮政编码: 210008
电话: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China
Tel: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史 学 正
主 管 中 国 科 学 院
主 办 中 国 土 壤 学 会
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng
Superintended by Chinese Academy of Sciences
Sponsored by Soil Science Society of China
Undertaken by Institute of Soil Science,
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码: 100717

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司
总 发 行 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码: 100717
电话: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company
Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China
Tel: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国 外 发 行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京 399 信箱 邮政编码: 100044

Foreign China International Book Trading Corporation
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号: CN 32-1119/P

国内邮发代号: 2-560

国外发行代号: BM45

定价: 60.00 元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929



0 1 >

9 770564 392156

DOI:10. 11766/trxb201404230193

土壤提取液中酰基高丝氨酸内酯的
气相色谱-质谱检测方法优化*

生弘杰^{1,3} 宋 洋¹ 卞永荣¹ 柳广霞¹ 蒋 新¹
P. Schmitt-Kopplin² 王 芳^{1,3†}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)
(2 Department of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Neuherberg, Germany)
(3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 建立并优化了利用气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactones, AHLs)的分析方法。通过优化升温程序,采用选择离子检测(m/z 143),可同时检测 7 种 AHLs(C_4 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_{10} 、 C_{12} 和 C_{14}),检出限分别为 1.50、2.00、1.50、2.00、2.00、2.50 和 2.50 $\mu\text{g l}^{-1}$,在 2.0 mg l^{-1} 浓度范围内均呈线性关系($R^2 > 0.997$)。加标回收率实验表明,采用乙酸乙酯萃取,水中 7 种 AHLs 的回收率均在 54%~97% 之间;不同比例的土水体系中,砖红壤和黄棕壤提取液中 AHLs 的回收率均在 56%~108% 之间。不同介质中 AHLs 回收率与其 LogP 值(P: AHLs 在正丁醇和水溶液中的分配比)及水溶解度对数均显著相关,表明采用乙酸乙酯萃取水和土壤提取液中的 AHLs 时,回收率主要与 AHLs 的 LogP 值和水溶解度有关。采用该方法对土壤提取液中 AHLs 进行测定发现砖红壤和黄棕壤提取液中 7 种 AHLs 的浓度分别为 3.8~8.7 $\mu\text{g l}^{-1}$ 和 4.2~9.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ 。因此,不仅对于水溶液,土壤提取液等复杂介质中的 AHLs 也可以采用乙酸乙酯萃取后 GC-MS 进行分析测定。

关键词 信号分子;萃取;回收率;气相色谱-质谱;土壤提取液
中图分类号 O657.63; O657.71; O658.2 **文献标识码** A

群体感应(Quorum sensing, QS)即微生物间的信息交流,是指微生物自发产生、释放一些特定的信号分子,并能感知其浓度变化,从而调节微生物的群体行为^[1]。随着微生物学的深入发展, QS 现象渐渐被大家所熟知,它不仅存在于种内还存在于种间甚至与宿主进行交流^[2-3]。许多微生物的生理特性和活动均与群体感应息息相关。革兰氏阴性菌的群体感应一般是由 LuxI/R 型信息系统调控,并以酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactones, AHLs)作为自诱导剂,即信号分子^[4]。AHLs 是一类特殊的小分子水溶性化合物(表 1),能够很容易通过细胞膜。由于小分子在细菌胞间传递信息,在

某种意义上使得细菌间能相互交流。研究表明, AHLs 在许多生理过程中发挥着重要作用,比如:病原细菌胞外酶和毒素的产生、生物膜的形成、生物发光、色素产生、抗生素形成和细菌运动等等^[5-7]。我们的最新研究表明,微生物信号传导还与有机污染物的微生物降解有关^[8]。目前,对 AHLs 信号分子检测方法主要有酶联免疫^[9]、生物传感器^[10-12]、薄层层析^[13]、和色谱方法。其中,生物传感器^[10-12]和薄层层析^[13]是分析 AHLs 化合物最常用的方法。其中,生物传感器检测精度达飞摩尔级,但每种 AHLs 均需要特定的菌株和质粒,且完成测定需要 1d 的时间。薄层层析精

* 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目第五课题(2014CB441105)、国家自然科学基金项目(21277148, 41030531, 41301240)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室优秀青年人才项目资助
† 通讯作者, E-mail: wangfang@issas.ac.cn
作者简介: 生弘杰(1989—),男,山东东营人,硕士研究生,主要研究信号传导在微生物降解土壤污染物过程中的作用与机制。 E-mail: hjsheng@issas.ac.cn
收稿日期: 2014-04-23; 收到修改稿日期: 2014-06-26

度不高,只能用来测定较高浓度的 AHLs。酶联免疫法简单、方便、快捷,但不能确定 AHLs 结构。色谱法通常需要复杂的样品前处理,比较耗时,但由于其能够准确分析多种 AHLs,应用也越来越普遍。色谱方法包括气相色谱-质谱(GC-MS)^[14-16],超高效液相色谱(UPLC)^[17-18],傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS)^[19-20]等。UPLC 可以同时定量分析含羟基、羰基的多种 AHLs。FT-ICR-MS 是一种新兴的鉴定 AHLs 结构的高精度分析方法。但由于这两种仪器比较昂贵,实验室普及率较低。GC-MS 方法能够同时定性、定量地检测 AHLs。本文建立并优化了 GC-MS 检测 AHLs 的方法,并建立土壤提取液中 AHLs 的提取测定方法,为进一步深入研究土壤环境中微生物的信号传导与群体感应提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

AHLs 标准品(C₄-HSL、C₆-HSL、C₇-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL 和 C₁₄-HSL)购于美国 Sigma 公司,具体理化性质见表 1^[21]。乙酸乙酯(色谱纯)购于 J. T. Baker 公司(美国)。将一定量的 AHLs 用乙酸乙酯溶解并配制成 1 000 mg l⁻¹ 的标准储备液,于 -20℃ 下保存备用。

1.2 GC-MS 检测条件的优化及 AHLs 标准曲线与检出限的确定

采用 GC-MS(美国 Agilent 7890A/5975C, 7693 自动进样器)对 AHLs 进行定性定量分析。色谱条件:色谱柱为 Agilent HP-5MS 石英毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm);载气为高纯氮气,主要通过改变进样温度与模式和升温程序等优化色谱条件。首先调节初始柱温、升温程序和载气流速,接着对进样口温度进行优化,最后采用分流模式,优化分流比。质谱条件:电子能量 70 eV,离子源温度 230℃,四级杆温度 150℃。先采用全扫描模式进行分析,然后采用选择离子模式进行检测,进样量为 1 μl。

用乙酸乙酯将 AHLs 母液稀释为 0 ~ 2 mg l⁻¹ 范

围内 12 个不同梯度的标准溶液,GC-MS 测定,绘制标准工作曲线。同时,将 AHLs 母液逐级稀释,GC-MS 测定,直至 AHLs 恰好检出,确定 7 种 AHLs 标样的检出限;土壤提取液中 AHLs 的检出限根据标样的检出限和土壤提取液中 AHLs 的测定方法(1.5)计算得到。

1.3 水中 AHLs 的加标回收率实验

取 0.5 ml 去离子水于 2 ml 离心管中,分别加入 10 μl 25 mg l⁻¹ 或 100 mg l⁻¹ 的混标样品(C₄、C₆、C₇、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₄),涡旋振荡 10 min,使得水中 AHLs 的浓度分别为 0.5 mg l⁻¹ 和 2 mg l⁻¹。取 1 ml 乙酸乙酯,加入上述离心管中,漩涡萃取 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min 后,吸取上层乙酸乙酯相于新离心管中(离心管中事先加入 1 g 无水 Na₂SO₄),漩涡振荡 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min 后,吸取上层有机相 0.5 ml 于进样瓶中,GC-MS 测定。

1.4 土壤提取液中 AHLs 的加标回收率实验

取海南砖红壤、南京黄棕壤分别以土水比 1:2、1:5、1:10 的比例加入到 50 ml 离心管中,以 160 r min⁻¹ 震荡 8 h 制备土壤提取液,接着以 4 000 r min⁻¹ 离心 5 min,分别取上清液 0.5 ml 于离心管中,加入 10 μl 25 mg l⁻¹ 或 100 mg l⁻¹ 的混标样品,涡旋震荡 10 min,使得水中 AHLs 的浓度分别为 0.5 mg l⁻¹ 和 2 mg l⁻¹。加入 1 ml 乙酸乙酯,漩涡萃取 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min,吸取上层乙酸乙酯相于含有 1 g 无水 Na₂SO₄ 的新离心管,漩涡振荡 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min,吸取上层有机相 0.5 ml 于进样瓶中,GC-MS 测定。

1.5 土壤提取液中 AHLs 的测定

在 50 ml 离心管中分别加入 10 g 海南砖红壤或南京黄棕壤,然后以土水比 1:2 的比例加入 20 ml 水,以 160 r min⁻¹ 震荡 8 h 制备土壤提取液,接着以 4 000 r min⁻¹ 离心 5 min,分别取上清液 0.5 ml 于 2 ml 离心管。加入 1 ml 的乙酸乙酯,漩涡萃取 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min,吸取上层乙酸乙酯相于含有 1 g 无水 Na₂SO₄ 的新离心管,漩涡混匀 2 min,12 000 r min⁻¹ 离心 2 min,吸取上层有机相 0.5 ml 于进样瓶中,GC-MS 测定。

表 1 7 种常见酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 信号分子的理化性质^[21]

Table 1 Physical-chemical properties of 7 commonly observed acyl-homoserine lactones (AHLs)

酰基高丝氨酸内酯 AHLs	简写 Acronym	分子式 Formular	分子量 Molecular mass (Da)	水溶性 Water solubility (mg l ⁻¹)	极性 Polarity	标化分 配系数 Koc	辛醇-水分配系数 Kow	LogP
N-butanoyl HSL	C ₄ -HSL	C ₈ H ₁₃ NO ₃	171.2	1.40 × 10 ⁵	5.80	5.99	9.51	0.03
N-hexanoyl HSL	C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	199.3	1.48 × 10 ⁴	5.81	30.47	48.37	1.02
N-heptanoyl HSL	C ₇ -HSL	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	213.3	4.76 × 10 ³	6.00	57.67	91.54	1.51
N-octanoyl HSL	C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	227.3	1.53 × 10 ³	6.19	1.09 × 10 ²	1.73 × 10 ²	1.97
N-decanoyl HSL	C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	255.4	1.55 × 10 ²	5.90	3.25 × 10 ²	5.16 × 10 ²	2.96
N-dodecanoyl HSL	C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃	283.4	15.62	6.44	1.40 × 10 ³	2.23 × 10 ³	4.02
N-tetradecanoyl HSL	C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₃ NO ₃	311.5	1.56	6.54	4.66 × 10 ³	7.39 × 10 ³	5.09

注:P 表示 AHLs 在正丁醇和水溶液中的分配比 Note:P stands for partition of AHLs between n-butyl alcohol and water

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 检测 AHLs 条件的优化

使用 GC-MS 检测 AHLs 标准品,采用全扫描模式,根据实验结果的灵敏度和分析时间优化升温程序。首先采用不分流模式,载气流速 0.8 ml min⁻¹,进样口温度为 250℃,初始柱温设为 120℃,35℃ min⁻¹梯度升至 280℃时,此时出峰时间较快,且分子离子峰较为紧凑,难以彻底分离。当 25℃ min⁻¹升至 280℃,则出峰时间较长。之后将载气流速设为 1ml min⁻¹,柱温由 35℃ min⁻¹梯度上升至 150℃,紧接着 25℃ min⁻¹梯度升至 280℃,保持 6 min,此时 7 种 AHLs 能够完全分离,但分子离子峰峰形较宽。针对性的将初始温度降至 80℃时,保留时间会

延长;高于 160℃时,C₄-HSL 就会消失,最终优化初始柱温为 100℃。接下来以 5℃ min⁻¹梯度缓慢升高进样口温度时,各种分子离子峰会变得越来越窄,拖尾现象逐渐消失,并在 290℃时达到最佳。此外还发现采用分流模式,峰形会更加尖锐,优化分流比为 5:1。优化各种条件以后,7 种 AHLs 在 12 min 内完全分离(图 1),AHLs 随着 C 原子数的增加而依次出峰,具体保留时间见表 2。最优条件下,5 次连续测定同一标准样品,保留时间的标准偏差小于 0.2%。对检测到的 7 个峰进行质谱鉴定,每种化合物的质谱图均呈现各自的分子离子峰[M]⁺,即 C₄-HSL (m/z 171)、C₆-HSL (m/z 199)、C₇-HSL (m/z 213)、C₈-HSL (m/z 227)、C₁₀-HSL (m/z 255)、C₁₂-HSL (m/z 283)和 C₁₄-HSL (m/z 311)。由于 C₇-HSL 在自然界中很少存在,从其他 6 种 AHLs 的

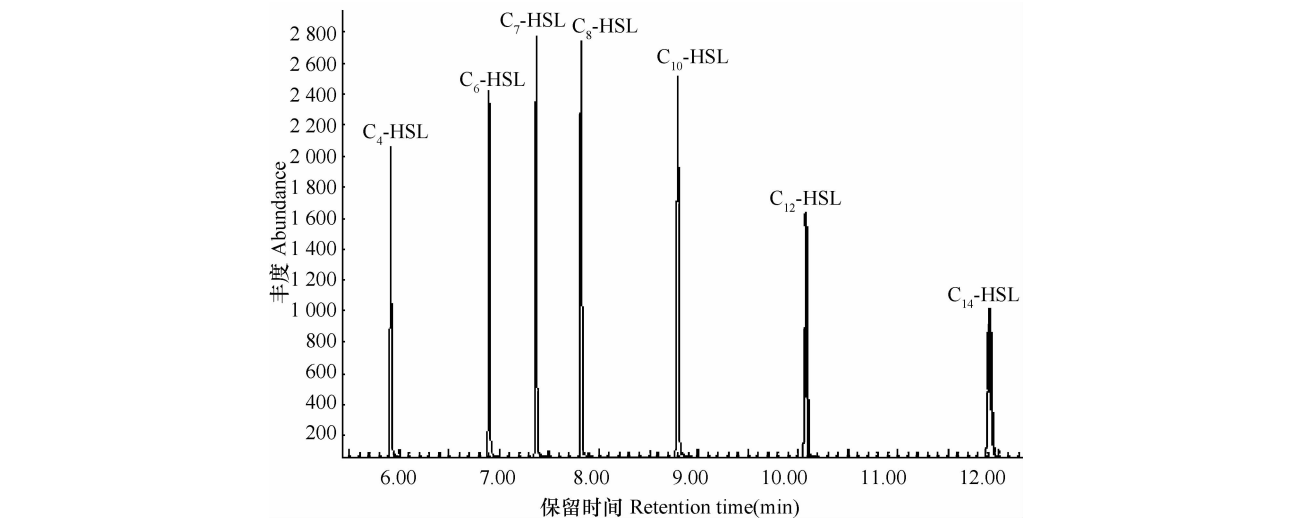


图 1 7 种酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 标样的 GC/MS 色谱图

Fig. 1 GC-MS chromatograph of the standards of 7 acyl-homoserine lactones

http://pedologica.issas.ac.cn

离子碎片中发现(图2), m/z 143 处丰度值较高,且在 m/z 101、71、57 和 43 等处出现其他的离子峰。

对 7 种 AHLs 裂解规律作进一步分析,发现由于麦氏重排反应,产生大量烯醇和烯烃碎片,碎片离子 m/z 143 较为丰富,碎片离子 m/z 143 失去水分子变为离子 m/z 125,其他的碎片离子 m/z 71、 m/z 57 和 m/z 43 主要通过重排反应过程中 α -裂解和

诱导裂解所产生^[22]。在实验条件下,对于碎片离子 m/z 101 最合理的解释是 AHLs 侧链发生 α -裂解导致。由于 7 种 AHLs 分子均含有丰富的 m/z 143 碎片离子(图2),可以选择 m/z 143 离子作为标记碎片,采用选择离子模式,对未知样品中的 AHLs 进行检测。因此,下文所有样品均以优化的色谱条件和选择离子模式(m/z 143)进行分析测定。

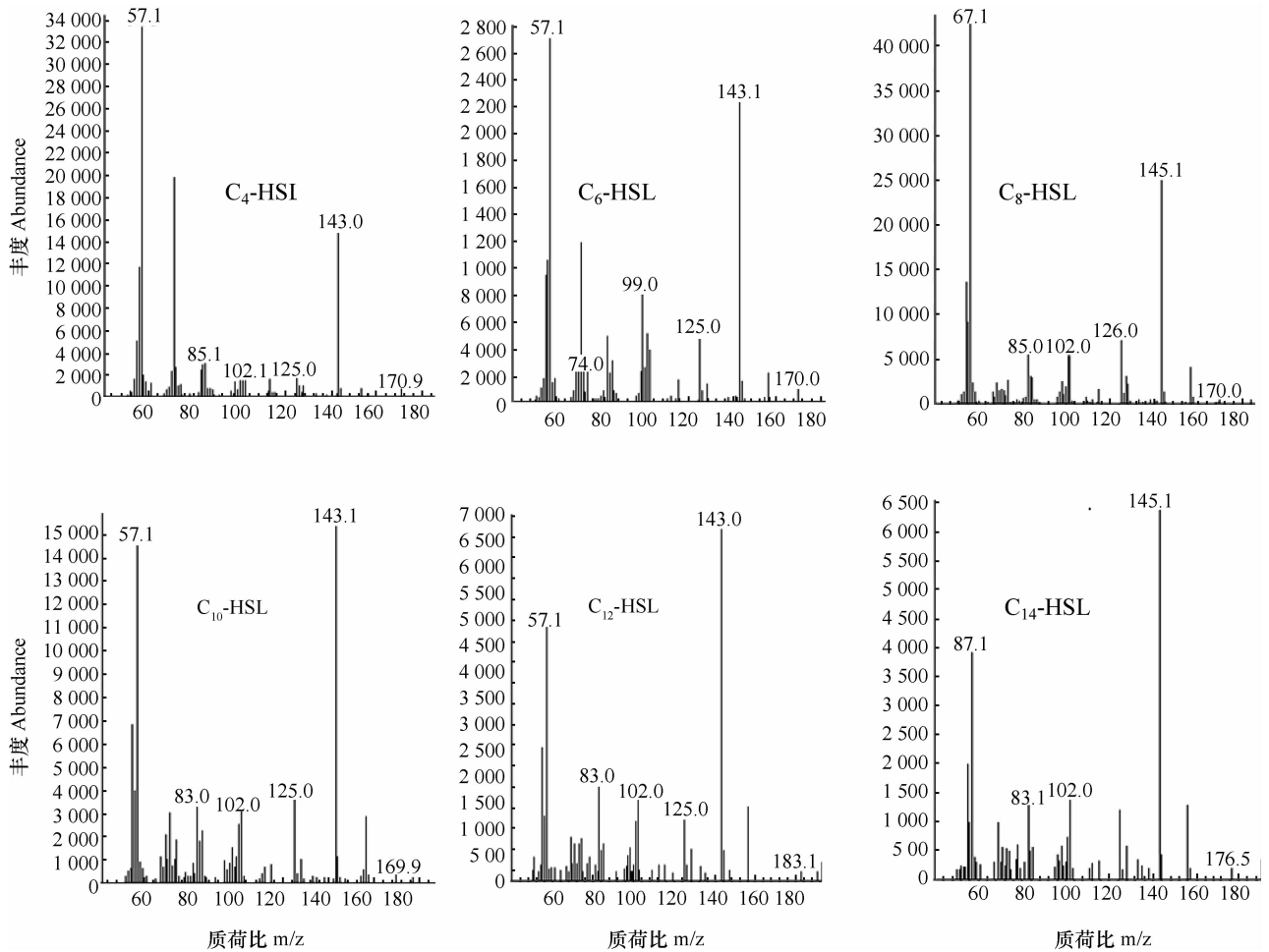


图2 7种酰基高丝氨酸内酯(AHLs)标样的质谱图
Fig. 2 GC-MS spectra of the standards of 7 acyl-homoserine lactones (AHLs)

2.2 AHLs 的标准曲线和检出限

7 种 AHLs 标准曲线在 2.0 mg l^{-1} 以内均有很好的线性关系,其决定系数 R^2 均大于 0.997 (表2)。7 种 AHLs 标准品的检出限在 $1.5\sim2.5\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ 之间,而土壤提取液中 7 种 AHLs 的检出限在 $3.0\sim5.0\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ 之间。

2.3 水中 AHLs 的加标回收率

在去离子水加标回收率实验中,7 种 AHLs 回收率的标准偏差在 8% 以内(表3),表明该方法的精

密度很高。除 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 以外,其他 6 种 AHLs 的回收率均较高(表3):当加标浓度为 0.5 mg l^{-1} 时,回收率在 76%~85% 之间;加标浓度为 2.0 mg l^{-1} 时,回收率在 74%~97% 之间。两种加标浓度下, $\text{C}_4\text{-HSL}$ 的回收率均较低,在 55% 左右(表3)。这是由于 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 在水中溶解度相对其他 AHLs 较高(表1),根据相似相溶的原理,疏水性有机溶剂-乙酸乙酯较难将其从水中萃取出来。

表 2 酰基高丝氨酸内酯(AHLs)的回归方程和检出限

Table 2 Linear equation and detection limit of acyl-homoserine lactones (AHLs)

酰基高丝氨酸内酯 AHLs	保留时间 Retention time(min)	线性回归方程 Linear regression equation	决定系数 R^2	标样检出限 Detection limit of standards ($\mu\text{g l}^{-1}$)	土壤提取液检出限 Detection limit in soil solution ($\mu\text{g l}^{-1}$)
C ₄ -HSL	5.920	$Y = 1.044X - 0.29$	0.998	1.50	3.00
C ₆ -HSL	6.910	$Y = 1.210X - 0.38$	0.999	2.00	4.00
C ₇ -HSL	7.374	$Y = 1.371X - 0.56$	0.999	1.50	3.00
C ₈ -HSL	7.821	$Y = 1.448X - 0.67$	0.999	2.00	4.00
C ₁₀ -HSL	8.811	$Y = 1.635X - 0.69$	0.999	2.00	4.00
C ₁₂ -HSL	10.09	$Y = 1.338X - 0.78$	0.999	2.50	5.00
C ₁₄ -HSL	11.94	$Y = 1.101X - 0.01$	0.997	2.50	5.00

表 3 水中酰基高丝氨酸内酯(AHLs)的加标回收率

Table 3 Recoveries of acyl-homoserine lactones (AHLs) in water

酰基高丝氨酸内酯 AHLs	添加浓度 Spiked concentration (mg l^{-1})	平均回收率 Mean recovery (%)	标准偏差 STD (%)
C ₄ -HSL	0.5	54.29	3.78
	2.0	56.19	1.49
C ₆ -HSL	0.5	75.56	5.36
	2.0	96.67	3.00
C ₇ -HSL	0.5	80.00	6.23
	2.0	88.33	2.89
C ₈ -HSL	0.5	82.67	6.43
	2.0	92.67	3.78
C ₁₀ -HSL	0.5	85.24	7.87
	2.0	91.43	0.00
C ₁₂ -HSL	0.5	84.00	8.11
	2.0	90.67	4.06
C ₁₄ -HSL	0.5	84.44	5.05
	2.0	73.78	3.01

2.4 土壤提取液中 AHLs 的加标回收率

与水中 AHLs 的回收率实验结果类似,C₄-HSL 回收率较低,2 种土壤的 3 个土水比提取液中的回收率均在 56%~71% 之间(表 4),同样是由于 C₄-HSL 在土壤提取液中溶解度相对其他 AHLs 较高,乙酸乙酯较难将其从土壤提取液中萃取出来。其他 6 种 AHLs 回收率较高:当加标浓度为 0.5 mg l⁻¹

和 2.0 mg l⁻¹ 时,红壤 3 种土水比回收率分别在 71%~93% 和 68%~104% 之间;黄棕壤的回收率分别在 80%~108% 和 67%~102% 之间。而且,两种土壤对同一种 AHLs 的回收率无显著差异,表明土壤提取液中的有机、无机化合物对这种提取方法无影响,进而说明该方法可有效用于不同土壤提取液中 AHLs 的定量分析与比较。

表 4 不同土水比提取液中酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 的加标回收率

酰基高丝氨酸内酯 AHLs		回收率 Recovery (%)					
		砖红壤 Latosolic red soil			黄棕壤 Yellow brown soil		
		1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
添加浓度 Spiked concentration (mg l ⁻¹)							
C ₄ -HSL	0.5	59.66 ± 8.20	58.88 ± 9.04	55.77 ± 5.80	61.47 ± 4.84	59.96 ± 0.33	66.75 ± 6.62
	2.0	70.91 ± 1.82	62.42 ± 12.34	59.54 ± 6.70	69.09 ± 2.92	62.73 ± 2.10	67.73 ± 5.06
C ₆ -HSL	0.5	93.17 ± 4.15	93.45 ± 6.34	85.66 ± 7.99	91.61 ± 7.94	90.46 ± 0.41	100.48 ± 9.01
	2.0	103.63 ± 2.67	91.67 ± 3.39	85.26 ± 2.67	101.92 ± 3.16	89.42 ± 6.09	93.27 ± 8.33
C ₇ -HSL	0.5	81.22 ± 10.60	87.90 ± 5.20	79.02 ± 9.52	86.48 ± 8.63	85.82 ± 0.55	95.84 ± 8.26
	2.0	103.49 ± 4.83	92.55 ± 4.90	84.10 ± 3.84	101.38 ± 3.75	89.29 ± 3.33	91.01 ± 8.70
C ₈ -HSL	0.5	86.31 ± 8.66	86.99 ± 11.19	88.29 ± 11.92	94.25 ± 11.21	94.63 ± 1.37	102.37 ± 4.39
	2.0	103.52 ± 2.66	93.80 ± 4.50	83.92 ± 4.02	102.01 ± 2.94	90.70 ± 2.03	89.20 ± 8.85
C ₁₀ -HSL	0.5	86.27 ± 7.75	88.24 ± 11.22	88.24 ± 8.99	99.61 ± 2.43	99.61 ± 3.73	108.23 ± 4.61
	2.0	98.80 ± 9.34	93.50 ± 1.70	80.33 ± 2.92	97.56 ± 6.43	89.61 ± 3.98	84.04 ± 9.07
C ₁₂ -HSL	0.5	79.61 ± 6.54	88.18 ± 9.52	81.18 ± 7.60	94.12 ± 6.00	93.33 ± 5.45	102.94 ± 4.05
	2.0	87.10 ± 6.56	88.11 ± 0.77	72.11 ± 0.87	86.43 ± 1.05	83.92 ± 1.81	74.62 ± 7.40
C ₁₄ -HSL	0.5	71.32 ± 3.40	72.95 ± 7.56	75.07 ± 10.89	79.06 ± 10.00	83.92 ± 8.55	95.30 ± 8.75
	2.0	71.88 ± 7.43	79.61 ± 4.03	67.55 ± 2.81	77.66 ± 2.68	80.59 ± 4.02	67.02 ± 5.03

2.5 AHLs 回收率与理化性质的关系

通过对不同介质中 AHLs 的平均回收率与其理化性质的关系进行分析,发现 AHLs 的回收率与

LogP 值(P:AHLs 在正丁醇和水溶液中的分配比)、侧链碳原子数和水溶解度的对数均呈显著正相关关系(图 3a、图 3b 和图 3c),而 AHLs 的回收率与极

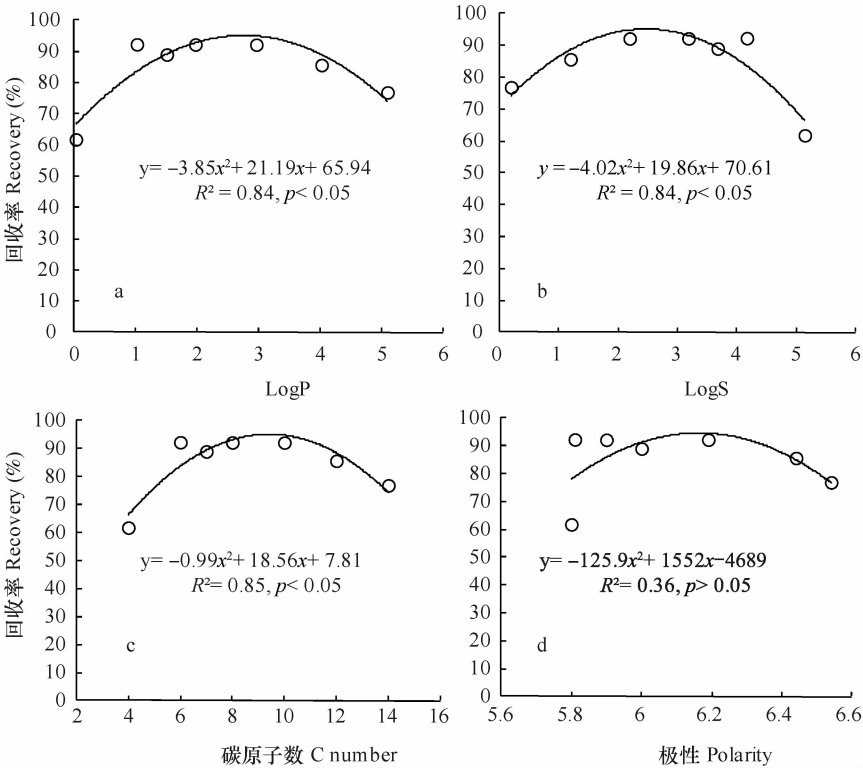


图 3 水和土壤提取液中酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 回收率与 LogP 值 (a)、水溶解度 (b)、侧链碳原子数 (c) 和极性 (d) 的关系

Fig. 3 Relationships between the recovery and the LogP (a), solubility in water (b), number of C molecules in the side chain (c) and polarity (d) of acyl-homoserine lactones (AHLs) in water and soil solutions

性未呈显著相关关系(图 3d),这表明采用乙酸乙酯萃取水和土壤提取液中的 AHLs 时,回收率主要与 AHLs 的 LogP 值和水溶解度有关。随着 AHLs 的 LogP 值、侧链碳原子数和水溶解度的增加,回收率呈现先增加后降低的趋势,这与 Morin 等^[23]采用二氯甲烷提取菌液中 AHLs 的规律类似。

2.6 土壤提取液中 AHLs 的分析

砖红壤和黄棕壤提取液中 AHLs 的分析结果见表 5,可以看到,两种土壤提取液中各种 AHLs 的浓度均比较接近,其中,砖红壤提取液中 7 种 AHLs 的浓度在 3.80~8.69 μg l⁻¹之间,黄棕壤提取液中 7 种 AHLs 的浓度在 4.19~9.78 μg l⁻¹之间。这些结果表明,该检测方法可以有效用于复杂环境介质——土壤提取液中 AHLs 的定量监测与比较。

表 5 砖红壤和黄棕壤提取液中酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 的浓度

Table 5 Concentrations of acyl-homoserine lactones (AHLs) in the solutions of Latosolic red soil and yellow brown soil

酰基高丝氨酸内酯 AHLs	土壤提取液中浓度 The concentration in soil solution(μg l ⁻¹)	
	砖红壤 Latosolic red soil	黄棕壤 Yellow brown soil
C ₄ -HSL	8.69 ± 0.72	9.78 ± 1.18
C ₆ -HSL	3.81 ± 0.29	4.19 ± 0.47
C ₇ -HSL	7.86 ± 0.24	8.58 ± 1.02
C ₈ -HSL	3.80 ± 0.06	4.29 ± 0.57
C ₁₀ -HSL	7.90 ± 0.20	8.47 ± 1.99
C ₁₂ -HSL	5.66 ± 0.10	6.03 ± 0.81
C ₁₄ -HSL	7.26 ± 0.00	7.29 ± 0.06

3 结 论

建立并优化了利用 GC-MS 测定 AHLs 的分析方法,并通过水溶液和土壤提取液的加标回收率实验,表明乙酸乙酯对 7 种 AHLs (C₄-HSL、C₆-HSL、C₇-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL) 的回收率主要与其 logP 值和水溶解度有关,其中,C₆-HSL、C₇-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 的回收率较高,为进一步深入研究 AHLs 信号分子在土壤中的环境行为奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Juhas M, Eberl L, Tummlier B. Quorum sensing: The power of

cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4): 459—471

[2] Shiner E K, Rumbaugh K P, Williams S C. Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl-homoserine lactones. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(5): 935—947

[3] Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 2007, 153(12): 3923—3938

[4] Barnard A L, Salmond G C. Quorum sensing in *erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387 (2): 415—423

[5] Alagely A, Krediet C J, Ritchie K B, et al. Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. *ISME Journal*, 2011, 5 (10): 1609—1620

[6] Parsek M R, Greenberg E P. Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 27—33

[7] Shih P C, Huang C T. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 49 (2): 309—314

[8] Wang F, Fekete A, Harir M, et al. Soil remediation with a microbial community established on a carrier: Strong hints for microbial communication during 1, 2, 4-trichlorobenzene degradation. *Chemosphere*, 2013, 92(11): 1403—1409

[9] Chen X, Kremmer E, Gouzy M F, et al. Development and characterization of rat monoclonal antibodies for n-acylated homoserine lactones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398 (6): 2655—2667

[10] Huang J J, Han J I, Zhang L H, et al. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil *Pseudomonad* and *Pseudomonas aeruginosa* paol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5941—5949

[11] McClean K H, Winson M K, Fish L, et al. Quorum sensing and chromobacterium violaceum: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of n-acylhomoserine lactones. *Microbiology-UK*, 1997, 143: 3703—3711

[12] Yan L, Allen M S, Simpson M L, et al. Direct quantification of n-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactone in culture supernatant using a whole-cell bioreporter. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(1): 40—45

[13] Shaw P D, Ping G, Daly S L, et al. Detecting and characterizing n-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(12): 6036—6041

[14] Cataldi T R I, Bianco G, Palazzo L, et al. Occurrence of n-acyl-l-homoserine lactones in extracts of some gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2007, 361(2): 226—235

[15] Moon H S. Identification of homoserine lactone derivatives using the methionine functionalized solid phase synthesis by gas chromatography/mass spectrometry. *Archives of Pharmacal Research*,

- 2004, 27(1): 25—30
- [16] 郭秀春, 郑立, 张魁英, 等. 气相色谱-质谱法检测细菌中 N-酰基高丝氨酸内酯类信号分子. 分析测试学报, 2012, 31(3): 347—350. Guo X C, Zheng L, Zhang K Y, et al. Determination of n-acyl-homoserine lactones signal molecules by gas chromatography-mass spectrometry (In Chinese). Fenxi Ceshi Xuebao, 2012, 31(3): 347—350
- [17] Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Ping G, et al. A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration-nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of n-acylhomoserine lactones. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378: 1014—1020
- [18] 马晨晨, 李柏林, 欧杰, 等. 高效液相色谱—串联质谱法同时测定细菌群体感应效应的 11 种 AHLs 类信号分子. 分析化学研究报告, 2010, 38(10): 1428—1432. Ma C C, Li B L, Ou J, et al. Detection of n-acyl-homoserine lactones class signal molecules of quorum sensing secreted by bacteria using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (In Chinese). Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(10): 1428—1432
- [19] Li X, Fekete A, Englmann M, et al. At-line coupling of UPLC to chip-electrospray-FTICR-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(5): 1439—1446
- [20] Wang J, Quan C, Wang X, et al. Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on n-acyl homoserine lactones. Microbial Biotechnology, 2011, 4(4): 479—490
- [21] Fekete A, Frommberger M, Rothballer M, et al. Identification of bacterial N-acyl-homoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(2): 455—467
- [22] Cataldi T R I, Bianco G, Frommberger M, et al. Direct analysis of selected n-acyl-l-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, 18(12): 1341—1344
- [23] Morin D, Grasland B, Vallée-Réhel K, et al. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of n-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. Journal of Chromatography A, 2003, 1002(1/2): 79—92

OPTIMIZATION OF DETERMINATION OF N-ACYL-HOMOSERINE LACTONES IN SOIL SOLUTION WITH GAS-CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Sheng Hongjie^{1,3} Song Yang¹ Bian Yongrong¹ Liu Guangxia¹ Jiang Xin¹ P. Schmitt-Kopplin² Wang Fang^{1,3†}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Department of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Neuherberg, Germany)

(3 University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Quorum sensing, the communication between microorganisms, is mediated by specific diffusible signal molecules. Gram-negative bacteria generally use N-acyl-homoserine lactones (AHLs) as their command language in coordinating their intra- and intercellular population behaviors. AHLs play an important role in controlling diverse physiological processes, including generation of extracellular toxin and enzymes by pathogenic bacteria, formation of biofilm, bioluminescence, biosynthesis of antibiotics, bacteria motility, etc. The authors have found in their recent studies that communication of microbial signals is closely related to microbial degradation of organic pollutant. Therefore, the detection and quantification of AHLs are essential for investigation of quorum sensing in gram-negative bacteria. Currently, there are several AHLs detection methods, including mainly enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), biosensor, thin layer chromatography (TLC) and chromatography.

In this study, a fast, simple selective method was established for detecting N-acyl-homoserine lactones (AHLs) in soil solution by the GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry). The novel method can detect AHLs qualitatively and quantitatively at the same time. Using the full scan mode, seven kinds of AHLs (C_4 , C_6 , C_7 , C_8 , C_{10} , C_{12} and C_{14} -HSL) standards were analyzed by GC-MS. The best results in terms of selectivity and time consumption of the analysis were obtained. Sample injection was done in the split mode (5:1) and pure helium (99.999%) was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml min^{-1} . The GC injector temperature was optimized to 290°C . The oven temperature program was optimized to start from 100°C to 150°C at a rate of $35^\circ\text{C min}^{-1}$ and then to 280°C at a rate of $25^\circ\text{C min}^{-1}$ and maintained for 6 min. Under

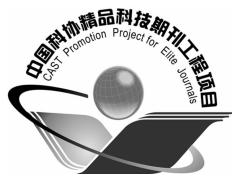
such optimized conditions, all the 7 kinds of AHLs were well separated within 12 minutes. Furthermore, the mass spectrum of the 7 AHLs exhibited a molecular ion peak $[M]^+$ that was unique of each compound, i. e. C_4 -HSL (m/z 171), C_6 -HSL (m/z 199), C_7 -HSL (m/z 213), C_8 -HSL (m/z 227), C_{10} -HSL (m/z 255), C_{12} -HSL (m/z 283) and C_{14} -HSL (m/z 311). Probably as a result of the McLafferty rearrangement, they generated a common fragment ion m/z 143. As the 7 AHLs all contained abundant m/z 143 ions, the ions could be used as a marker fragment to detect AHLs in unknown samples on mass detector operating in the SIM mode. The detection limits of the seven AHLs (C_4 , C_6 , C_7 , C_8 , C_{10} , C_{12} and C_{14} -HSL) standards were 1.50, 2.00, 1.50, 2.00, 2.00, 2.50, and 2.50 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively. The standard curves of all the 7 AHLs displayed nice linear relationships up to 2.0 mg l^{-1} and their coefficients of determination were all higher than 0.997.

The recovery experiment using ethyl acetate as extracting agent shows that in the solutions with spiking concentrations being 0.5 mg l^{-1} and 2.0 mg l^{-1} , recoveries of 6 AHLs (C_6 , C_7 , C_8 , C_{10} , C_{12} and C_{14} -HSL) varied in the ranges of 76%~85% and 74%~97%, respectively, whereas the recovery of C_4 -HSL was relatively low, being about 55% for both spiking concentrations. In 3 soil solutions of Latosolic red soil and Yellow brown soil, different in soil/water ratio, the recoveries of C_4 -HSL ranged from 56% to 71% for both spiking concentrations, while the recoveries of the other 6 AHLs were all relatively higher, being in the ranges of 71%~108% and 68%~104% for spiking concentration of 0.5 mg l^{-1} and 2.0 mg l^{-1} , respectively. No significant difference was observed in recovery of each AHL relative to soil solution, indicating that the organic and inorganic compounds in the soil solutions have no influence on extraction of AHLs in soil solutions using ethyl acetate. In addition, significant relationships were observed between the recovery of AHLs in different media and their logP (P stands for partion between normal butanol and water) as well as logS (solubility in water), but no relationship was between the recovery of AHLs and their polarity, showing that the recovery of AHLs were mainly related to their logP values and solubility in water. Therefore, this extracting method coupled with GC-MS can be effectively applied to analysis of AHLs in different soil solutions. Thereafter AHLs concentrations in the soil solutions were determined. It was found that the concentrations of the 7 AHLs varied in the range of 3.8~8.7 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 4.2~9.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ in the solutions of Latosolic red soil and yellow brown soil, respectively.

It could be concluded that AHLs in both aquatic solution and complex media, such as soil solution, can be analyzed using GC-MS coupled with ethyl acetate extraction。

Key words Signaling molecular; Extraction; Recovery; GC-MS; Soil solution

(责任编辑:檀满枝)



综述与评论

农业土壤学研究:侯光炯学术思想形成之考察——纪念侯光炯先生诞辰 110 周年..... 申丽娟 丁恩俊 陈绍兰等(1)

土壤多样性研究趋势与未来挑战 任圆圆 张学雷(9)

土壤磷酸盐氧同位素分析方法和应用研究进展 张 晗 王佳妮 郭庆军等(19)

研究论文

土壤制图多等级代表性采样与分层随机采样的对比研究 杨 琳 朱阿兴 张淑杰等(28)

河南省典型淋溶土土系划分研究 鞠 兵 吴克宁 李 玲等(38)

黄土坡面细沟侵蚀发育过程与模拟 吴淑芳 刘政鸿 霍云云等(48)

黄土丘陵区小流域土壤有效水空间变异及其季节性特征 高晓东 吴普特 张宝庆等(57)

科尔沁沙丘-草甸相间地区表土饱和和导水率的土壤传递函数研究 孙 丽 刘廷玺 段利民等(68)

砒砂岩风化物对土壤水分特征曲线及蒸发的影响 张 磊 齐瑞鹏 张应龙等(77)

稳定同位素²⁰²Hg 稀释技术测定土壤汞有效性——与化学提取方法比较 郑顺安 徐志宇 王 飞等(87)

土壤提取液中酰基高丝氨酸内酯的气相色谱-质谱检测方法优化 生弘杰 宋 洋 卞永荣等(95)

复合污染土壤中土霉素的吸附行为及其对土壤重金属解吸影响的研究 陈励科 马婷婷 潘 霞等(104)

污染区千金子和酢浆草根际土壤中 PAHs 结合态残留的梯度分布 王意泽 高彦征 彭安萍等(112)

土壤磷解吸特性对菜稻轮作田间渗漏水总磷浓度的影响 章明清 李 娟 孔庆波(120)

湖区小麦-玉米轮作模式下不同施肥措施调控氮磷养分流失研究 谭德水 江丽华 谭淑樱等(128)

鄱阳湖洲滩湿地土壤-水-植物系统中磷的静态迁移研究 徐 进 徐力刚 丁克强等(138)

菇菜套作对土壤微生物群落的影响 陈 敏 王军涛 冯有智等(145)

黄土高原油松根际土壤酶活性及真菌群落多样性研究——以黄龙山林场为例 褚洪龙 李 莎 唐 明(154)

硅介导番茄青枯病抗性的土壤定量蛋白质组学研究 陈玉婷 林威鹏 范雪滢等(162)

有机无机肥配施对红壤旱地花生生理特性、产量及品质的影响 许小伟 樊剑波 陈 晏等(174)

氮素富集对青藏高原高寒草甸土壤有机碳迁移和累积过程的影响 李林森 程淑兰 方华军等(183)

长期施肥下黑土活性有机质和碳库管理指数研究 何翠翠 王立刚 王迎春等(194)

火烧和保留采伐剩余物对土壤有机碳矿化的影响 吴君君 杨智杰 刘小飞等(203)

研究简报

碳氮稳定同位素检测能力的验证——2013 年实验室间比对分析结果的汇总 曹亚澄 韩 勇 唐昊冶等(212)

土壤厚度的划分标准与案例研究 易 晨 李德成 张甘霖等(220)

积盐条件下土壤酸化过程的特异性研究 王媛华 段增强 赵 宇等(228)

四川省不同区域水稻氮肥施用效果研究 张 智 王伟妮 李 昆等(234)

小叶锦鸡儿灌丛化对退化沙质草地土壤孔隙特征的影响 李宗超 胡 霞(242)

信息

《土壤学报》2013 年度优秀论文评选揭晓 (241)

封面图片:黄土坡面细沟形态发育过程(由吴淑芳提供)

CONTENTS

Reviews and Comments

Agricultural soil science research: Formation of Hou Kuangchun's academic thought—Celebrate 110th anniversary of Mr Hou Kuangchun's birth	Shen Lijuan, Ding Enjun, Chen Shaolan, et al. (8)
Study on pedodiversity: Status quo and future challenges	Ren Yuanyuan, Zhang Xuelei(17)
Advance in study on method for oxygen isotopic analysis of phosphate in soil and its application	Zhang Han, Wang Jiani, Guo Qingjun, et al. (26)

Research Articles

A comparative study of multi-grade representative sampling and stratified random sampling for soil mapping	Yang Lin, Zhu A-xing, Zhang Shujie, et al. (37)
Classification of Typical Argosols of Henan Province at soil series level of Chinese Soil Taxonomy	Ju Bing, Wu Kening, Li Ling, et al. (47)
Development of rill erosion on loess slope and its simulation	Wu Shufang, Liu Zhenghong, Huo Yunyun, et al. (55)
Spatial variability of available soil moisture and its seasonality in a small watershed in the hilly region of the Loess Plateau	Gao Xiaodong, Wu Pute, Zhang Baoqing, et al. (66)
Prediction of saturated hydraulic conductivity of surface soil in sand-dune-and-meadow interlaced region of Horqin with pedo-transfer functions method	Sun Li, Liu Tingxi, Duan Limin, et al. (75)
Effects of amendment of aeolian sandy soil and loess with soft sandstone on soil water retention curve and evaporation	Zhang Lei, Qi Ruipeng, Zhang Yinglong, et al. (85)
Comparison between stale isotope ²⁰² Hg dilution technique and chemical extraction in determining Hg availability in two typical soils of China	Zheng Shunan, Xu Zhiyu, Wang Fei, et al. (94)
Optimization of determination of N-acyl-homoserine lactones in soil solution with Gas-Chromatography-Mass Spectrometry	Sheng Hongjie, Song Yang, Bian Yongrong, et al. (102)
Sorption behavior of oxytetracycline in complex contaminated soil and its effects on desorption of heavy metals in the soil	Chen Like, Ma Tingting, Pan Xia, et al. (111)
Gradient distribution of bound-PAH residues in different layers of rhizosphere soils of moleplant and wood sorrel growing in polluted regions	Wang Yize, Gao Yanzheng, Peng Anping, et al. (118)
Soil P desorption characteristics and their effects on total P concentration in percolating water in fields under vegetable-rice rotation system	Zhang Mingqing, Li Juan, Kong Qingbo(127)
Effects of fertilization controlling nitrogen and phosphorus loss from farmland under wheat-maize rotation in Nansi Lake region	Tan Deshui, Jiang Lihua, Tan Shuying, et al. (137)
Static transfer of phosphorus in the soil-water-plant system of beach wetlands in Poyang Lake	Xu Jin, Xu Ligang, Ding Keqiang, et al. (144)
Changes in soil microbial community in response to tomato- <i>Agaricus bisporus</i> interplanting	Chen Min, Wang Juntao, Feng Youzhi, et al. (152)
Soil enzyme activity and fungal community diversity in rhizosphere of <i>Pinus tabulaeformis</i> Carr. growing on Loess Plateau— A case study of Huanglongshan forest farm	Chu Honglong, Li Sha, Tang Ming(161)
Soil quantitative proteomic analysis of silicon-mediated resistance of tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) to <i>Ralstonia solanacearum</i>	Chen Yuting, Lin Weipeng, Fan Xueying, et al. (172)
Effect of manure combined with chemical fertilizer application on yield, kernel quality and physiological characteristics of peanut to red soil in subtropical China	Xu Xiaowei, Fan Jianbo, Chen Yan, et al. (181)
Effects of nitrogen enrichment on transfer and accumulation of soil organic carbon in alpine meadows on the Qinghai-Tibetan Plateau	Li Linsen, Cheng Shulan, Fang Huajun, et al. (192)
Effect of long-term fertilization on labile organic matter in and carbon pool management index of black soil	He Cuicui, Wang Ligang, Wang Yingchun, et al. (202)
Effect of prescribed burning and reservation of logging residues on soil organic carbon mineralization	Wu Junjun, Yang Zhijie, Liu Xiaofei, et al. (210)

Research Notes

Testing of proficiency for measurement of carbon and nitrogen stable isotopes ...	Cao Yacheng, Han Yong, Tang Haoye, et al. (218)
Criteria for partition of soil thickness and case studies	Yi Chen, Li Decheng, Zhang Ganlin, et al. (227)
Specificity of soil acidification affected by salt accumulation	Wang Aihua, Duan Zengqiang, Zhao Yu, et al. (233)
Effects of nitrogen fertilization on rice in different regions of Sichuan Province	Zhang Zhi, Wang Weini, Li Kun, et al. (240)
Effects of shrub (<i>Caragana microphylla</i> Lam) encroachment on soil porosity of degraded sandy grassland	Li Zongchao, Hu Xia(248)

Cover Picture: Rill morphological development process on loess slope (by Wu Shufang)