



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220155

发菜伴生细菌的分离鉴定及其对发菜生理代谢的影响

韩成凤, 林亚慧, 刘姝婷, 韩培培, 贾士儒
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了探究发菜(*Nostoc flagelliforme*)伴生菌对其生理代谢的影响,进一步了解发菜的生长体系以及发菜与伴生菌的相互作用,本文采用平板划线法从发菜固体培养基上分离出 11 株伴生菌,利用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-qToF-MS)鉴定伴生菌产生的 N-酰基高丝氨酸内酯类分子(AHLs)种类.通过质谱图可知微杆菌属(*Microbacterium* sp.)ABNF-1 产生 C₁₂-HSL,根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)ABNF-4 产生 C₆-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL,戈登氏菌属(*Gordonia* sp.)ABNF-9 产生 C₆-HSL、C₁₀-HSL,假单胞菌属(*Pseudomonas balearica* sp.)ABNF-10 产生 C₁₀-HSL、C₁₂-HSL.对发菜 AHLs 产生菌共培养的代谢产物分析表明,主成分分析(PCA-X)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)的评分都呈现明显的离散现象,表明共培养组的代谢产物发生了变化,发菜的脂肪酸代谢和碳代谢发生了显著变化.通过外源添加 AHLs 发现,当群体感应信号分子 AHLs 浓度为 5 μmol/L 以上时,AHLs 能够促进荚膜多糖的积累,提高细胞总糖含量,对发菜多糖含量影响显著,这进一步说明 AHLs 能够影响发菜细胞的生长代谢.

关键词: 发菜; 群体感应信号分子 AHLs; 代谢产物; 发菜多糖

中图分类号: Q819 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2023)01-0001-09

Isolation and Identification of Associated Bacteria from *Nostoc flagelliforme* and Its Effects on Physiological Metabolism of *Nostoc flagelliforme*

HAN Chengfeng, LIN Yahui, LIU Shuting, HAN Peipei, JIA Shiru
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In our study we intended to study, the effects of the associated bacteria of *Nostoc flagelliforme* on its physiological metabolism so as to further understand the growth system of *N. flagelliforme* and the interaction between *N. flagelliforme* and associated bacteria. Eleven strains of associated bacteria were isolated from *N. flagelliforme* solid medium by plate scribing method. The species of N-acylhomoserine lactone-like molecules (AHLs) were identified in associated bacteria by high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-qToF-MS). From the mass spectrum, we found that *Microbacterium* sp. ABNF-1 produced C₁₂-HSL, *Rhizobium* sp. ABNF-4 produced C₆-HSL, C₁₀-HSL and C₁₂-HSL, *Gordonia* sp. ABNF-9 produced C₆-HSL and C₁₀-HSL, and *Pseudomonas balearica* sp. ABNF-10 produced C₁₀-HSL and C₁₂-HSL. The analysis of metabolites in the co-culture of *N. flagelliforme* and AHLs producing bacteria showed that the score of principal component analysis (PCA-X) and orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) showed obvious dispersion, indicating that the metabolites in the co-culture group changed, and the fatty acid metabolism and carbon metabolism of *N. flagelliforme* changed significantly. Through exogenous addition of AHLs, we found that when the concentration of signal molecules exceeded 5 μmol/L, it promoted the accumulation of capsular polysaccharide, increased the total sugar content of cells, and significantly affected the polysaccharide yield of *N. flagelliforme*, which further indicated that AHLs could affect the growth and metabolism of *N. flagelliforme* cells.

Key words: *Nostoc flagelliforme*; quorum sensing signal molecules AHLs; metabolites; *N. flagelliforme* polysaccharide

发菜是一种分布广泛的陆生固氮蓝细菌,常生长于干旱少雨的荒漠地带,因其具有营养价值、生态意

收稿日期: 2022-06-20; 修回日期: 2022-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32172191)

作者简介: 韩成凤(1995—),女,山东聊城人,硕士研究生;通信作者: 韩培培,教授, pphan@tust.edu.cn

义和药用价值而备受关注^[1-4]。通过采用多聚链式反应-变性梯度凝胶电泳技术 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 对野生发菜细菌群落进行研究, 发现发菜能够促进其他微生物的生长, 包括自养细菌和异养细菌, 因此越来越多的研究集中在藻类与细菌的相互作用关系上^[5]。维系藻菌关系的基础是营养依赖, 微藻可以产生多种生物活性物质, 如多糖、蛋白聚糖和其他胞外产物等。这些活性物质作为氮源和碳源可以供相关细菌生长。研究^[6]显示, 大量微藻与细菌共生于珊瑚内, 前者进行光合作用向珊瑚和细菌提供氧气, 细菌通过分解有机物提供碳源促进珊瑚及微藻的生长。通过研究根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的共生关系, 发现细菌可以为藻类生长提供氮源, 藻类可以为细菌生长提供碳源^[7]。藻类和细菌相互作用的另一种方式是信号转导, 二者分泌的胞外产物可以调节藻类和细菌之间的关系, 通过激活/抑制生物活性或基因表达影响藻类和细菌的生长。

群体感应 (quorum sensing) 是细菌根据外界环境变化自发产生和分泌特定的信号分子, 同时感知其浓度的变化, 完成细胞间的交流, 从而调节微生物的群体行为^[8]。因此, 独立群体感应系统的受体、信号转导机制和目标输出反映了特定细菌物种所进行的独特生物过程。目前发现的群体感应信号分子主要包括 G^- 细菌分泌的 N-酰基高丝氨酸内酯类分子 (AHLs)、 G^+ 细菌释放的寡肽类化合物 (AIPs) 以及种间群体感应信号分子 (AI-2)。 G^- 细菌分泌的 AHLs, 也称为自诱导物 1 (AI-1)。 G^- 细菌群体感应系统可以调节多种生理功能, 如生物发光、毒力因子的产生和胞外多糖 (EPS) 的合成。 G^+ 细菌中寡肽自诱导物的传感器通过细胞膜结合, 进行一系列磷酸化传递信息^[9-10]。然而, 发菜悬浮培养物中的某些微生物能否产生群体感应信号分子 AHLs 调节种群行为尚不清楚。

近年来, 越来越多的代谢组学分析方法运用到藻类相关的研究中。代谢组学分析方法简单, 目标产物清晰, 稳定性高。根据目标代谢产物独特的理化性质, 通常采用质谱法 (MS)、气相色谱-质谱法 (GC-MS) 和液相色谱-质谱法 (LC-MS) 检测细菌与藻类细胞之间的关系^[11]。本研究对发菜细胞进行液体培养、涂板划线对发菜生长过程中的伴生菌进行分离, 并对能够产生 AHLs 的相关细菌进行了鉴定, 分析了发菜与 AHLs 伴生菌共培养的代谢物, 从代谢水平上研究

伴生菌对发菜的影响, 有助于进一步了解发菜的生长体系。

1 材料与方法

1.1 菌株

发菜细胞 (*Nostoc flagelliforme*) TCCC11757 由天津科技大学生物工程研究室提供。

1.2 菌种的培养

在无菌条件下, 静置收集活化后的发菜细胞悬浮液, 待细胞沉淀完全, 弃上清液后重悬于新鲜无菌的 BG11 培养基中, 于 750 nm 下调整悬浮液浓度, 使吸光度为 1.0, 作为细胞种子液。

1.3 伴生细菌的分离鉴定

取生长状态良好的菌悬液 1 mL, 稀释 100 倍。取 100 μ L 菌悬液涂在 BG11 固体平板上, 置于 25 $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养。待平板上长出菌落 (非绿藻菌落), 挑取形态不同的菌落使用接种环蘸取同一个位置, 分别在 LB 固体平板和 BG11 固体平板三区划线, 长出菌落后再划线至新的平板上进行纯化。新的 LB 平板上长出菌落后, 挑取单菌落进行菌落 PCR。

采用 16S rDNA 通用引物 1492R 和 27F 进行 16S rDNA 基因扩增, 利用可变区序列差异对不同菌属、菌种的细菌进行分类鉴定。1492R: 5'-AACTGGA GGAAGGTGGGGA-3', 27F: 5'-AGGAGGTGATCCA ACCGCA-3'。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 110 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

1.4 AHLs 产生菌的初步筛选以及 AHLs 种类的鉴定

细菌生物感应器根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) A136 能快速检测菌体是否产生群体感应信号分子 AHLs, 此方法可以初步筛选出 AHLs 产生菌。

将能够产生群体感应信号分子的菌体接种于 LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至对数期后, 培养液于 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 20 min。取上清液用等量的含有 0.5% 甲酸的乙酸乙酯萃取, 反复萃取 3 次, 合并上层有机相。将上述得到的乙酸乙酯萃取液置于旋转蒸发器内进行浓缩, 使用无水甲醇溶解浓缩的样品, 定容至 5 mL, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。将制备好的样品通过高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (LC-qToF-MS) 进行分析, 鉴定所产生群体感应信号分子的种类, 具体操作条件详见参考文献 [12]。

1.5 代谢物分析

将 AHLs 产生菌接种于 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养至对数生长期后期. 将培养液 5 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液并收集下层沉淀. 向离心管中加入新鲜的 BG11 培养基, 吹吸底部沉淀, 用涡旋振荡器低频振荡, 5 000 r/min 离心 5 min, 反复洗涤 5 次. 菌体接种的吸光度 A_{600} 为 0.4, 发菜初始接种的吸光度 A_{750} 为 0.35 ~ 0.40, 对照组不加菌体, 各设 3 个平行, 24 °C、1 000 lx 光照条件下培养, 每天至少手动摇 1 次. 连续培养 20 d 后, 测定发菜细胞内小分子代谢物. 发菜细胞内代谢物提取方法见参考文献[13]. 采用甲基硅烷化对样品进行衍生, 具体方法见参考文献[14].

使用气相色谱-质谱联用仪对样品进行定性和定量分析. 气相色谱为 Agilent 7890 A, 质谱检测器为 Agilent 5795 C; 色谱柱为 HP-5 毛细管柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), 汉密尔顿 CTC GC PAL 700 自动进样器, 进样量为 1 μL, 不分流进样; 离子源温度为 250 °C, 四级杆温度为 150 °C, 进样口温度为 270 °C; 载气为 H₂ (99.999%), 流量为 1 mL/min, 电离方式为电子轰击电离 (EI⁺). 升温程序: 70 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 290 °C, 290 °C 保持 6 min. 溶剂延迟 8 min. 扫描模式为 SCAN 模式, 扫描 m/z 范围为 50 ~ 500.

采用 Meschem 数据分析、自动质谱退卷积定性系统 (AMDIS) 联合分析代谢物的气相色谱-质谱联用检测结果, 代谢物峰面积的积分参数: 初始面积截留 0, 初始峰宽 0.1, 肩峰检测 OFF, 初始阈值 15.0. 每个样品设置 3 个平行, 利用 SIMCA-P 14.1 对原始数据进行多元统计分析. 代谢物的相对含量^[15]定义为

$$\text{代谢物的相对含量} = \frac{\text{代谢物的峰面积}}{\text{内标的峰面积} \times \text{细胞粉末质量}} \quad (1)$$

1.6 发菜生物量的测定

比浊法: 在波长 750 nm 处测定发菜细胞悬浮液的吸光度, 以 A_{750} 表示细胞的光密度.

干重法: 将发菜细胞悬浮液摇晃均匀后, 取 10 mL 于 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀的发菜细胞, 置于 90 °C 干燥烘箱烘至质量恒定后称量.

1.7 发菜多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定发菜胞外多糖含量^[16].

将培养结束后的细胞培养液于 4 000 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞, 再将藻细胞用 0.1 mol/L、pH 7.2 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 冻干, 研磨成粉末. 藻粉与去离子水按照质量比 1 : 120 的比例加入去离子水, 80 °C 水浴加热 4 h, 每隔 0.5 h 剧烈摇动 1 次, 离心收集上清液, 测定荚膜多糖 (CPS)^[17]. 采用苯酚-硫酸法测定上清液的荚膜多糖含量, 根据藻粉质量得到单位质量藻细胞的荚膜多糖含量.

1.8 发菜细胞中色素含量的测定

甲醇提取法^[18]: 摇匀藻液, 取样品 ($V_{\text{样品}}$, mL) 置于离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 将下层藻细胞重新悬浮于甲醇溶液 ($V_{\text{甲醇}}$, mL) 中, 在 4 °C 冰箱中避光储藏过夜, 再在相同转速下离心, 取上清液. 以甲醇溶液为参比液测定 665 nm、470 nm 下的吸光度, 提取液中的叶绿素含量 (ρ_{Chla} , μg/mL)、类胡萝卜素含量 (ρ_{Car} , μg/mL) 按式 (2) 和式 (3) 计算.

$$\rho_{\text{Chla}} = 13.43 \times A_{665} \times \frac{V_{\text{甲醇}}}{V_{\text{样品}}} \quad (2)$$

$$\rho_{\text{Car}} = \frac{1000 \times A_{470} - 44.76 \times A_{665}}{221} \times \frac{V_{\text{甲醇}}}{V_{\text{样品}}} \quad (3)$$

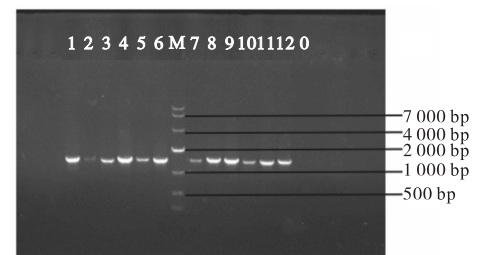
1.9 数据分析

所有数据显著性分析均采用 SPSS 20.0 进行配对样本 t 检验, *表示组间具有显著差异 ($P < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 发菜伴生菌的分离鉴定

挑取纯化平板上长出的单菌落进行 PCR, 伴生菌的 PCR 条带图如图 1 所示.



M. DL10000 DNA marker; 0. 阴性对照; 1—12. 分离得到的各个菌

图 1 伴生菌的 PCR 条带图

Fig. 1 PCR band diagram of associated bacteria

结果表明成功扩增出 16S rDNA 基因, 该基因序列大小为 1 500 bp 左右, 与细菌的 16S rDNA 基因大小基本一致.

将测序结果在 NCBI 数据库上进行 BLAST 比

对, 去掉碱基相似性高的菌株, 共筛选得到 11 株不同的菌, 选取对比结果中查询覆盖率和相似性最高的菌株作为相应菌株的菌名(表 1), 将其分别命名为

ABNF-1、ABNF-2、ABNF-3、ABNF-4、ABNF-5、ABNF-6、ABNF-7、ABNF-8、ABNF-9、ABNF-10 和 ABNF-11, 其命名规则为 ABNF-X.

表 1 ABNF 系列菌株基因序列相似性比较
Tab. 1 Comparison of gene sequence similarity of ABNF series strains

菌株	最相似菌株	查询覆盖率/%	相似性/%	编号
ABNF-1	<i>Microbacterium</i> sp. strain H200-610	100	100	MG754432.1
ABNF-2	<i>Gordonia terrae</i> sp. strain CLC-M30	100	100	MH518251.1
ABNF-3	<i>Pseudomonas balearica</i> sp. strain Y70	99	99	KU601277.1
ABNF-4	<i>Rhizobium</i> sp. strain ICMP 22291	100	99	MH392632.1
ABNF-5	<i>Sphingopyxis</i> sp. strain E12-3	99	100	KY938148.1
ABNF-6	<i>Variovorax</i> sp. BS1	100	100	FJ594446.1
ABNF-7	<i>Blastomonas natatoria</i> sp. strain E8-5	99	99	KY938126.1
ABNF-8	<i>Agrobacterium</i> sp. ZYSR66	100	100	AB905494.1
ABNF-9	<i>Variovorax paradoxus</i> sp. strain AL402	100	100	MG819280.1
ABNF-10	<i>Pseudomonas balearica</i> sp. strain Y91	100	100	KU601285.1
ABNF-11	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain HBUMB94	100	100	MF285784.1

2.2 群体感应信号分子 AHLs 产生菌的筛选及鉴定

对分离得到的发菜伴生菌进行测定, 利用细菌分泌 AHLs 会使细菌生物感应器产生特征性颜色变化这一特点来鉴定其是否产生 AHLs^[12]. 筛选结果如图 2 所示, 横向是报告菌株 A136, 纵向是待测菌株, 阴性对照不产生蓝色, 阳性对照产生明显蓝色, 从 11 株伴生菌中筛选得到能够产生 AHLs 的菌株, 分别为 ABNF-1、ABNF-4、ABNF-9、ABNF-10.

根据质谱图中的 m/z 确定物质, 检测到 C₆-HSL、C₇-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL 对应的 m/z 分别为 222.109 9、236.126 2、250.141 3、278.172 6、306.204 0.

对每个样品进行全质谱图搜索, 比对标准品色谱图中的 m/z . 微杆菌属 (*Microbacterium* sp.) ABNF-1 的 m/z 为 306.204 4; 根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.) ABNF-4 的 m/z 为 222.110 8、278.170 6、306.204 5; 戈登氏菌属 (*Gordonia* sp.) ABNF-9 的 m/z 为 222.115 3、278.178 3; 假单胞菌属 (*Pseudomonas balearica* sp.) ABNF-10 的 m/z 为 278.173 0、306.201 8.

根据质谱峰质量数, 采用 GC-MS 仪器上自带的软件计算其元素组成, 参考 AHLs 的结构及化学式, 结果见表 2^[19].

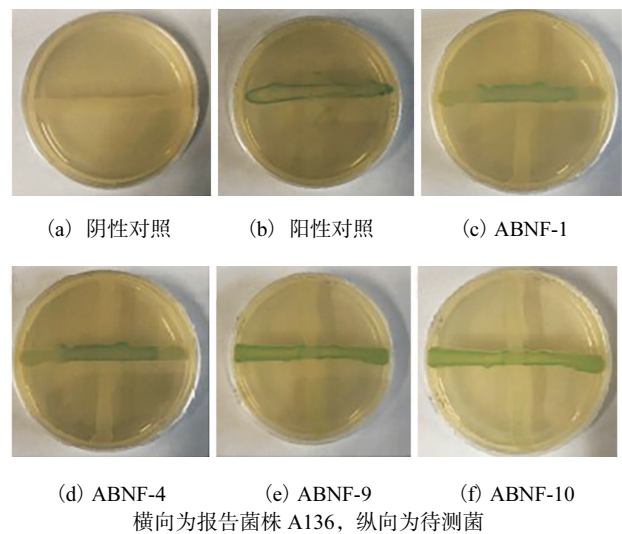


图 2 群体感应信号分子 AHLs 产生菌的初步筛选
Fig. 2 Preliminary screening of quorum sensing signal molecules AHLs producing bacteria

表 2 群体感应信号分子质谱分析结果

Tab. 2 Results of mass spectrometry of AHLs

菌株	[M + Na] ⁺ 质量/u		推测化学式	误差/ μ	确定 AHLs 种类
	标准品	样品			
ABNF-1	306.204 0	306.204 4	[C ₁₆ H ₂₅ NO ₃ + Na] ⁺	+0.4	C ₁₂ -HSL
	222.109 9	222.110 8	[C ₁₀ H ₁₃ NO ₃ + Na] ⁺	+0.9	C ₆ -HSL
ABNF-4	278.172 6	278.170 6	[C ₁₄ H ₂₁ NO ₃ + Na] ⁺	-2.0	C ₁₀ -HSL
	306.204 0	306.204 5	[C ₁₆ H ₂₅ NO ₃ + Na] ⁺	+0.5	C ₁₂ -HSL
ABNF-9	222.109 9	222.115 3	[C ₁₀ H ₁₃ NO ₃ + Na] ⁺	+5.4	C ₆ -HSL
	278.172 6	278.178 3	[C ₁₄ H ₂₁ NO ₃ + Na] ⁺	+5.7	C ₁₀ -HSL
ABNF-10	278.172 6	278.173 0	[C ₁₄ H ₂₁ NO ₃ + Na] ⁺	+0.3	C ₁₀ -HSL
	306.204 0	306.201 8	[C ₁₆ H ₂₅ NO ₃ + Na] ⁺	-2.6	C ₁₂ -HSL

与标准品相比,样品中质荷比偏差均低于 5.7 mu,经鉴定 *Microbacterium* sp. ABNF-1 产生 C₁₂-HSL, *Rhizobium* sp. ABNF-4 产生 C₆-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL, *Gordonia* sp. ABNF-9 产生 C₆-HSL、C₁₀-HSL, *Pseudomonas balearica* sp. ABNF-10 产生 C₁₀-HSL、C₁₂-HSL.

2.3 发菜与 AHLs 产生菌共培养后代代谢组学分析

2.3.1 胞内代谢物的检测及定量分析

将 AHLs 产生菌分别与发菜细胞共培养,空白组、ABNF-1 组、ABNF-4 组、ABNF-9 组、ABNF-10 组分别检测到 66、54、50、49、58 种代谢产物. 对各实验组中代谢产物进行定性定量分析,一共检测到 16 种糖类、15 种醇类、16 种有机酸类、7 种氨基酸、13 种烷类、33 种酯类、6 种胺类、7 种其他类物质.

2.3.2 发菜细胞内小分子代谢物的多元统计分析

主成分分析(PCA-X)是代谢组学领域常用的多元统计分析技术,通过无监督的统计分析方法对数据

进行降维. 通过无监督的 PCA-X 对空白组和共培养组发菜细胞内代谢产物进行初步分类,根据原始数据中协方差矩阵的结构,将新的原变量线性组合,得到主成分. 第一主成分轴是原始数据矩阵的最大方差方向,其他主成分所反映的差异程度依次降低,而且这些主成分相互正交,这样保证了从高维空间向低维空间投影时尽量保留有用信息^[20]. 如图 3(a)所示,两主成分的贡献率分别为 0.698 和 0.107,每个样本的平行样本聚合较近,但共培养组和对照组离散现象明显,说明添加菌体共培养会使发菜代谢发生改变. 实验组 ABNF-1、ABNF-9、ABNF-10 代谢状况与对照组差异大,实验组 ABNF-4 与对照组代谢差异小.

载荷图中代谢物离中心点距离越远,代表其贡献率越大. 如图 3(b)所示,共培养条件下贡献率较大的代谢物有乙二酸、己二酸、蔗糖、 α -D-吡喃葡萄糖苷、乙酸、乙酰胺、都兰糖、9,12,15-十八碳三烯酸甲酯等.

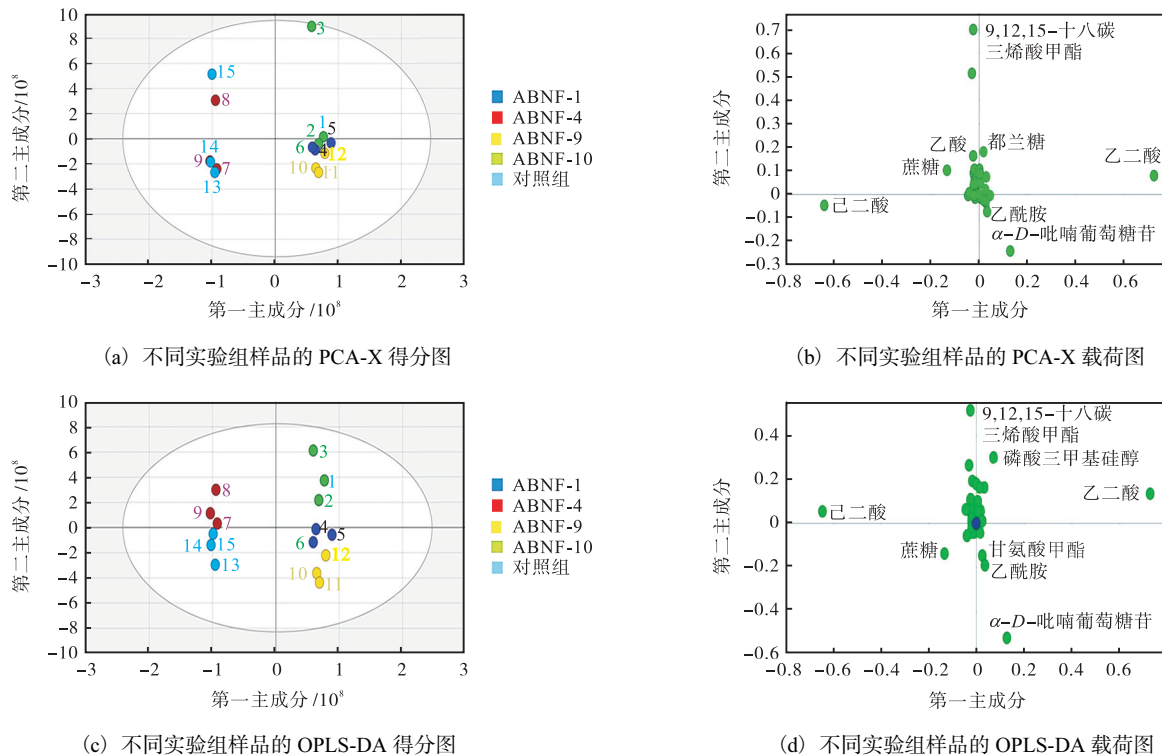


图 3 发菜细胞内小分子代谢物多元统计分析

Fig. 3 Multivariate statistical analysis of small molecular metabolites in *N. flagelliforme* cells

正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)作为一种有监督的判别分析统计方法,对样本数据矩阵和相应变量同时进行分解,并力图建立它们之间的回归关系,而 PCA-X 的主成分投影方向是偏差最大的方向^[21-22]. 影响发菜培养过程的因素有很多,PCA-X 分析是对全部信息进行分析,而 OPLS-DA 会根据所给

的相应变量进行矫正. 如图 3(c)所示, OPLS-DA 得分图和 PCA-X 得分图结果基本一致,两主成分的贡献率分别为 0.698 和 0.083. 第一主成分将实验组 ABNF-1、ABNF-9、ABNF-10 与对照组分开,第二主成分将实验组 ABNF-4 与对照组分开,进一步证明不同实验组间胞内代谢产物有较大区别.

对 OPLS-DA 载荷图 3(d) 进行分析, 其中代谢谱为矩阵 X , 单位荚膜多糖含量为矩阵 Y . 对多糖含量贡献率较高的代谢物包括乙二酸、己二酸、蔗糖、 α -D-吡喃葡萄糖苷、甘氨酸甲酯、乙酰胺、9, 12, 15-十八碳三烯酸甲酯等, 与 PCA-X 结果基本相同.

通过计算变量投影重要度 (VIP) 衡量各代谢物对样本的贡献程度, 从而辅助标志代谢物的筛选^[23]. 通常情况下, 截留 VIP 值大于 1.0 的代谢物进行分析. 不同实验组样品的 VIP 图如图 4 所示.

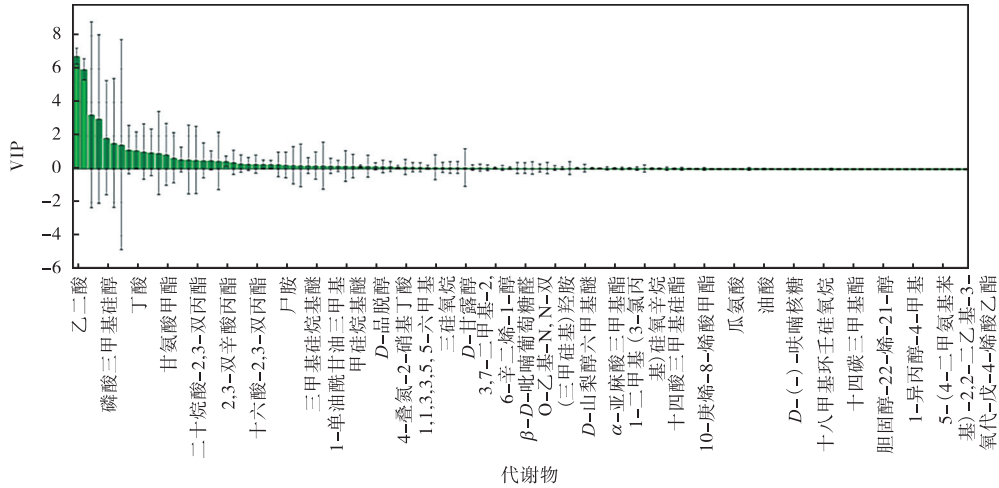


图 4 不同实验组样品的 VIP 图

Fig. 4 VIP results of samples from different experimental groups

由图 4 可知: 贡献率较大的物质依次为乙二酸、磷酸三甲硅醇、丁酸、甘氨酸甲酯、二十烷酸-2, 3-双丙酯、2, 3-双辛酸丙酯、十六酸-2, 3-双丙酯、尸胺, 得出贡献率较高的物质与载荷图中物质略有不同.

伴生菌中 AHLs 产生菌与发菜共培养后, 发菜基础代谢发生了一定的变化, 其中最显著的是碳代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢, 这些变化与调节藻菌之间生理代谢平衡相关. 研究^[24-25]发现, 藻菌共培养体系下, 微生物的生长需要藻细胞提供氮源, 氮源的缺乏使微藻进入胁迫状态, 进而能够显著促进脂肪酸的积累, 同时由于细菌分解的氮源能够被藻细胞利用, 所以能够继续维持微藻的生长繁殖. 本研究与以上结果基本一致, 藻菌共生体系的构建使脂肪酸含量显著增加, 表明藻菌之间能够进行物质交换. 在共培养实验组中, 发现与发菜糖代谢相关的蔗糖、海藻糖、呋喃核糖的含量极低, 伴生菌会在培养过程中直接利用发菜基础代谢物进行代谢生长, 导致共培养体系内发菜代谢中的基础糖类物质有所减少.

2.4 外源添加群体感应信号分子 AHLs 对发菜生长的影响

由质谱检测可知, 发菜伴生菌中能够产生 C_6 -HSL、 C_{10} -HSL 和 C_{12} -HSL. 为了进一步探究伴生菌产生的群体感应信号分子对发菜细胞生长代谢的影响, 本研究在发菜培养基中外源添加 C_6 -HSL、 C_{10} -

HSL 和 C_{12} -HSL, 对发菜生物量、多糖和色素含量进行检测, 分析细胞在特定条件下的生长情况, 结果如图 5—图 7 所示.

2.4.1 C_6 -HSL 对发菜细胞生长的影响

在发菜接种第 5 天时, 添加终浓度为 0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 C_6 -HSL, 各设置 3 个平行实验. 对发菜细胞相关指标进行测定发现, 在 5、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 C_6 -HSL 培养条件下, 发菜荚膜多糖含量显著增加, 分别比对照组增加了 22%、28%; 总糖含量即单位质量胞外多糖与单位质量荚膜多糖含量总和, 处理组比对照组分别增加了 19%、24%. 外源添加 C_6 -HSL 对发菜生物量、叶绿素和类胡萝卜素的含量无显著影响.

2.4.2 C_{10} -HSL 对发菜细胞生长的影响

C_{10} -HSL 处理组几乎对发菜生物量不产生影响, 类胡萝卜素含量与对照组相比无明显差异. 由图 6(c) 可知: 5、50 $\mu\text{mol/L}$ C_{10} -HSL 处理条件下的叶绿素含量比对照组显著降低. 由图 6(b) 可知: 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 C_{10} -HSL 对发菜胞外多糖、荚膜多糖和总糖含量有显著影响, 5、50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组分别比对照组增加了 19%、26%, 50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的总糖含量比对照组增加了 21%.

2.4.3 C_{12} -HSL 对发菜细胞生长的影响

由图 7 可以看出, 25 $\mu\text{mol/L}$ C_{12} -HSL 对发菜生物量、色素、多糖含量都有显著促进作用.

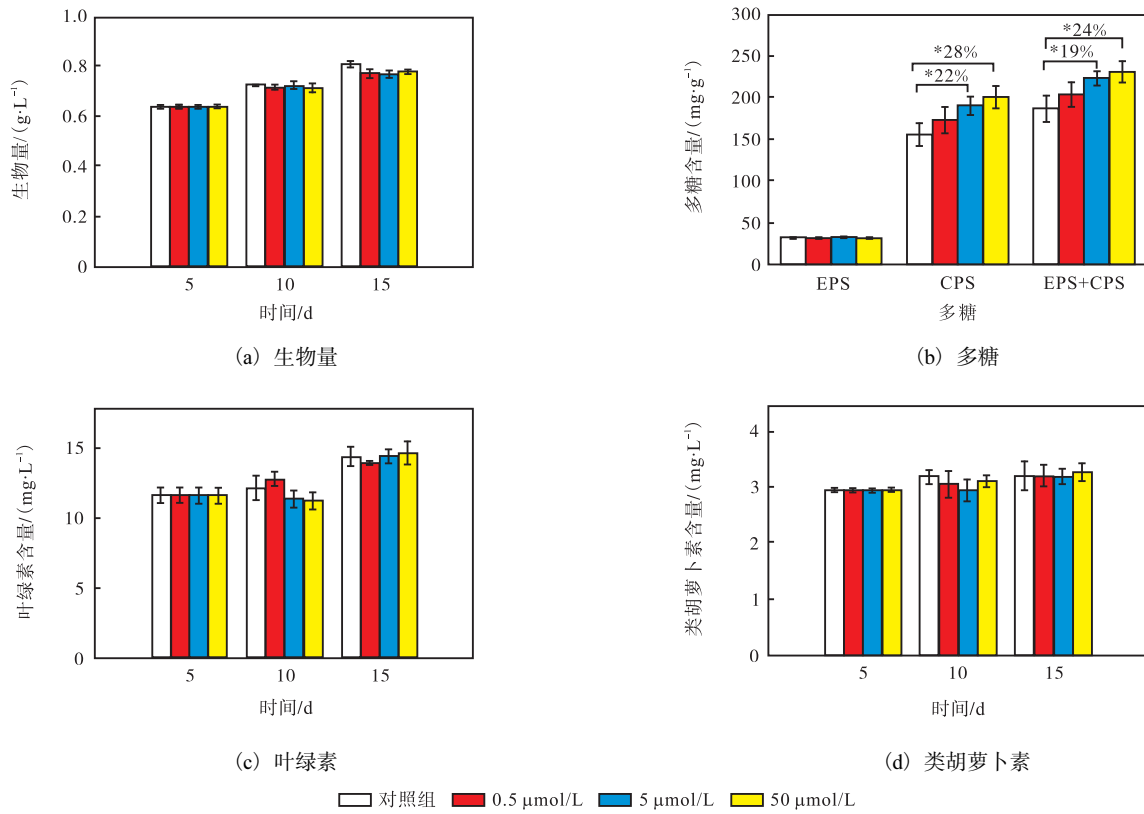


图 5 C_6 -HSL 对发菜生物量、多糖含量、色素含量的影响

Fig. 5 Effects of C_6 -HSL on biomass, polysaccharide content and pigment content of *N. flagelliforme*

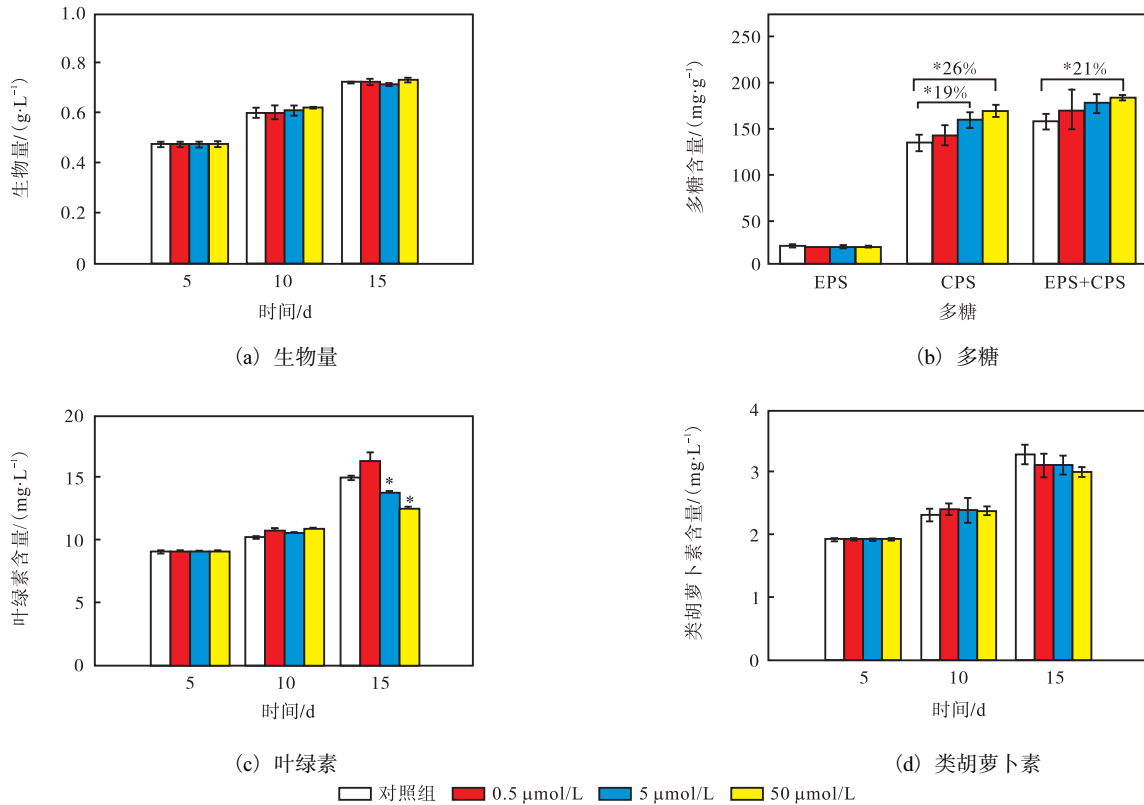


图 6 C_{10} -HSL 对发菜生物量、多糖含量、色素含量的影响

Fig. 6 Effects of C_{10} -HSL on biomass, polysaccharide content and pigment content of *N. flagelliforme*

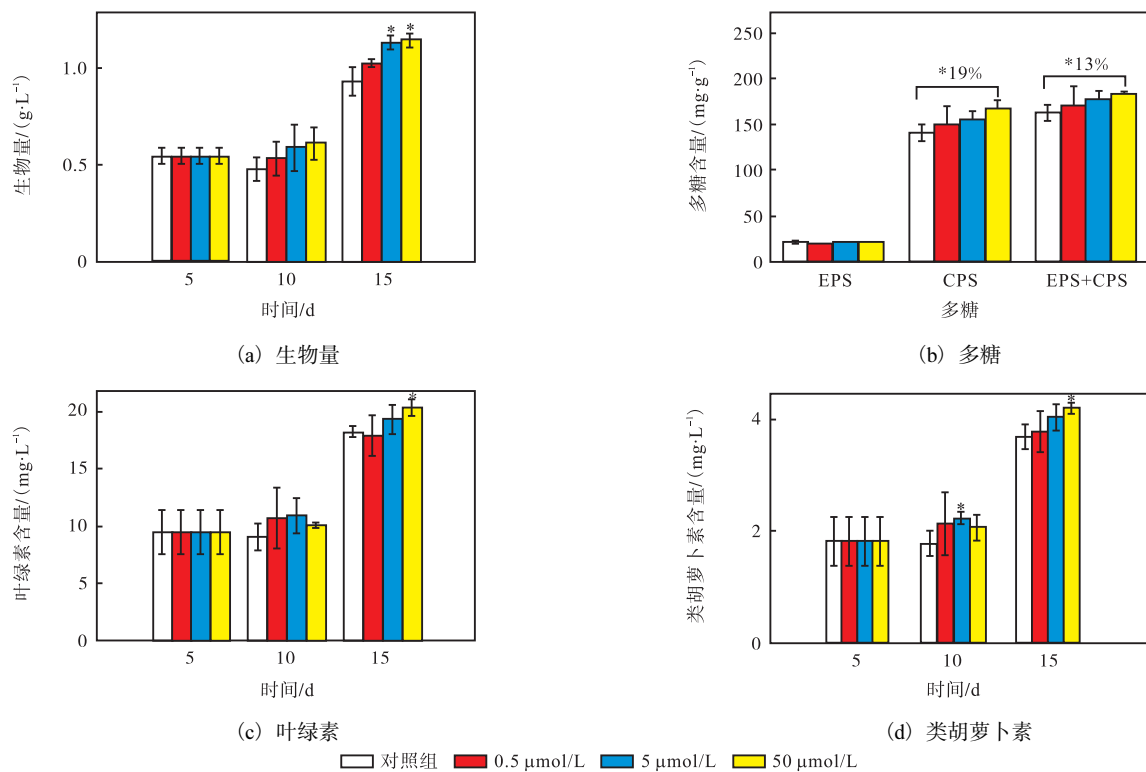


图7 C_{12} -HSL 对发菜生物量、多糖含量、色素含量的影响

Fig. 7 Effects of C_{12} -HSL on biomass, polysaccharide content and pigment content of *N. flagelliforme*

第 15 天, 25 $\mu\text{mol/L}$ C_{12} -HSL 处理组发菜生物量比对照组显著增加. 各实验组胞外多糖含量比对照组均有所增加, 从单位质量多糖含量来看, 25 $\mu\text{mol/L}$ C_{12} -HSL 处理组的荚膜多糖含量显著增加, 比对照组增加了 19%, 总糖含量比对照组增加了 13%. 这说明添加群体感应信号分子后, 发菜细胞对该作用条件有响应. 第 15 天时, 当外源添加 C_{12} -HSL 的浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 叶绿素含量和类胡萝卜素含量比对照组显著增加.

4 结 论

利用细菌生物感应器根癌农杆菌 A136 与 AHLs 产生菌能够产生特征性蓝色反应, 从 11 株发菜伴生菌中筛选得到能够产生 AHLs 的菌株, 利用 LC-qToF-MS 鉴定 AHLs 产生菌分泌群体感应信号分子的种类, 从质谱图可知 *Microbacterium* sp. ABNF-1 分泌 C_{12} -HSL, *Rhizobium* sp. ABNF-4 产生 C_6 -HSL、 C_{10} -HSL、 C_{12} -HSL, *Gordonia* sp. ABNF-9 产生 C_6 -HSL、 C_{10} -HSL, *Pseudomonas balearica* sp. ABNF-10 产生 C_{10} -HSL、 C_{12} -HSL. 对发菜与 AHLs 产生菌共培养过程中的代谢产物进行定性定量分析, 检测到发菜代谢物中有 16 种糖类、15 种醇类、16 种有机酸类、7

种氨基酸、13 种烷类、33 种酯类、6 种胺类、7 种其他类物质. 对发菜胞内小分子代谢物进行多元统计分析, PCA-X 和 OPLS-DA 得分图都呈现出明显的离散现象, 表明其胞内代谢物发生改变. 检测到共培养组与脂肪酸相关的代谢物含量显著增多, 这可能与藻菌之间频繁的物质交换有关. 糖代谢相关代谢物含量在共培养组有所降低, 说明伴生菌能够以更直接的方式利用发菜基础糖类代谢物. 外源添加不同浓度的 AHLs 发现, AHLs 会对发菜的代谢产物积累产生影响, 群体感应信号分子对生物量及色素含量影响不大, 但当 AHLs 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 对发菜多糖含量影响显著, 促进荚膜多糖的积累, 提高细胞总糖含量.

参考文献:

- [1] 戴治稼. 发菜研究的回顾[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 1992(1): 71-76.
- [2] 曾呈奎, 毕列爵, 张宪孔, 等. 藻类名词及名称[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [3] 韩培培, 贾士儒. 发菜细胞培养的研究进展[J]. 天津科技大学学报, 2016, 31(2): 1-5.
- [4] COLE J J. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems[J]. Annual review of ecology and

- systematics, 1982, 13(1):291-314.
- [5] HAN P, SHEN S, JIA S, et al. Comparison of bacterial community structures of terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in three different regions of China using PCR-DGGE analysis[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2015, 1(7):1061-1069.
- [6] KIM B, RAMANAN R, CHO D, et al. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction[J]. Biomass and bioenergy, 2014, 69:95-105.
- [7] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual review of cell and developmental biology, 2005, 21:319-346.
- [8] WEST A H, STOCK A M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems[J]. Trends in biochemical sciences, 2001, 26(6):369-376.
- [9] INOUE M, DUTTA R. Histidine kinases in signal transduction[M]. Amsterdam: Elsevier Science, 2003:314-359.
- [10] WECKWERTH W, WENZEL K, FIEHN O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks[J]. Proteomics, 2004, 4(1):78-83.
- [11] 任丽, 张永刚, 马睿, 等. 代谢组学及其在微藻研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1):166-172.
- [12] GUI M, LIU L, WU R. Detection of new quorum sensing N-acyl homoserine lactones from *Aeromonas veronii*[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9:1712.
- [13] GUADALUPE Z, MARTÍNEZ-PINILLA O, GARRIDO Á, et al. Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC) [J]. Food chemistry, 2012, 131(1):367-374.
- [14] LU S, WANG J, NIU Y, et al. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes[J]. Biotechnology and bioengineering, 2012, 109(7):1651-1662.
- [15] 黄昕琦, 蔡中华, 林光辉, 等. 群体感应信号对“藻-菌”关系的调节作用[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(4):708-717.
- [16] WATANABE M F, HARADA K, CARMICHAEL W W, et al. Toxic microcystis[M]. Boca Raton: CRC Press, 1995:103-135.
- [17] LOOIJESTEIJN P J, BOELS I C, KLEEREBEZEM M, et al. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source[J]. Applied and environmental microbiology, 1999, 65(11):5003-5008.
- [18] 李其雨, 李爱芬, 张成武. 真眼点藻类色素的提取与测定方法[J]. 生态科学, 2012, 31(3):278-283.
- [19] HUANG X, CAI Z, LIN G, et al. Regulation of quorum sensing signal on the relationship between algae and bacteria[J]. Journal of applied and environmental biology, 2016, 22(4):708-717.
- [20] 许国旺, 路鑫, 杨军. 代谢组学: 方法与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [21] COLEMAN J H. Review of guidance in secondary schools[J]. Journal of educational psychology, 1933, 5:397-398.
- [22] WANG C, KONG H, GUAN Y, et al. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis[J]. Analytical chemistry, 2005, 77(13):4108-4116.
- [23] SZETO S S W, REINKE S N, SYKES B D, et al. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase result in distinct metabolic phenotypes revealed through ¹H NMR-based metabolic footprinting[J]. Journal of proteome research, 2010, 9(12):6729-6739.
- [24] 王瑞民. 栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 的藻菌共生体系的构建及调控[D]. 北京: 中国科学院研究生院(过程工程研究所), 2015.
- [25] 程蔚兰. 三种能源微藻共生菌系的研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2018.