

李 琼, 张爱华, 郑 颖, 等. 2 种模式细菌对人参皂苷的化学趋向性响应[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 121–123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.035

2 种模式细菌对人参皂苷的化学趋向性响应

李 琼¹, 张爱华¹, 郑 颖², 匙 坤¹, 杨 鹤¹, 卢宝慧¹, 许永华¹, 张连学¹

(1. 吉林农业大学中药材学院/吉林省人参工程技术研究中心, 吉林长春 130118;

2. 潍坊工程职业学院应用化学与生物工程学院, 山东潍坊 262500)

摘要:采用毛细管法测定大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)在 4 种趋化参数(浓度、温度、pH 值和时间)下对人参总皂苷的化学趋向性响应。结果表明, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对低浓度人参总皂苷表现出较强的化学趋向性, 与阴性对照组相比, 趋化指数分别为 3.868、3.755; 与阳性对照组相比, 趋化指数分别为 1.075、1.175。研究结果显示, 低浓度的人参总皂苷对 2 种细菌的化学趋向性有促进作用, 但是随着浓度的增加而减弱。

关键词:人参总皂苷; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 化学趋向性

中图分类号: S567.5⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0121-03

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)为五加科人参属重要药用植物, 是我国的名贵中药材。然而在人参生长过程中, 连作障碍是影响其规范化种植的主要因素之一。据报道, 植物连作障碍的发生是由多方面因素导致的, 如病虫害高发、自毒物质积累、土壤营养失衡、土壤恶化等^[1]。在近几年的研究中, 根系分泌物生态效应的间接作用及土壤微生物种群比例失调被视为诱发植物连作障碍的主要因素, 某些种群微生物可借助趋化感应(chemotaxis response)利用根系分泌物中的特定组分, 实现快速增殖, 从而对其他有益微生物的生长产生抑制, 以此改变分泌物中的组分和数量, 进而为趋化性病原微生物提供更多碳源、能源, 形成恶性循环, 使植物生长发育不良^[2-6]。

人参皂苷是人参根系分泌物中一类主要次生代谢产物, 它不仅被视为土壤微生物的基质, 同时也在植物体与土壤微生物之间起着调节作用^[7-9]。人参病害暴发流行时期正是人参根系分泌物分泌最旺盛时期, 病害高发是导致人参连作障碍的先决条件。然而在这期间, 关于人参皂苷是否对人参根际微生物起到趋化作用、能否保持土壤微生态平衡等未见相关报道。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分别属于革兰氏阴性细菌(G⁻)、革兰氏阳性细菌(G⁺), 通常被作为模式微生物来研究, 这 2 种细菌在自然界中无处不在, 在空气、土壤、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到它们。大多数学者关注这 2 种细菌在人体或动物体

内的卫生学及致病性, 而忽视了它们在自然界中的存在对植物生态方面的影响。本试验以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌作为模式菌株, 探讨人参皂苷对其化学趋向性的影响, 以期为人参根际微生物的化学趋向性响应的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 供试药品 人参根系总皂苷由吉林农业大学张春红博士提供(纯度 80%)。氯化钠(分析纯), 北京化学工业集团有限责任公司; 牛肉膏(生物试剂纯度)、蛋白胨(生物试剂纯度), 北京奥博星生物技术有限责任公司; 琼脂粉(H8145), 上海稼丰园艺用品有限公司。

1.1.3 培养基 采用牛肉膏-蛋白胨培养基, 液体培养基配方: 5.0 g/L 牛肉膏, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L NaCl, pH 值 7.2~7.4; 固体培养基配方: 5.0 g/L 牛肉膏, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L NaCl, 20 g/L 琼脂, pH 值 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备 将-70℃保存的菌种接种到牛肉膏-蛋白胨固体培养基上, 于 37℃条件下培养 18~24 h。挑取单菌落于适量稀释液(0.90% NaCl, pH 值 7.2)中, 充分振荡混匀后制成一定浓度的菌液(约 10⁸ CFU/mL, D_{625nm}=0.1), 通过稀释得到 10⁷ CFU/mL 的菌液, 备用。

1.2.2 皂苷溶液的制备 用蒸馏水配制浓度分别为 12.500 0、1.250 0、0.125 0、0.012 5 mg/L 的人参总皂苷溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 备用。

对照设置: CK₁ 为阴性对照, 成分是无菌水; CK₂ 为阳性对照, 成分为无菌肉汤培养液。

1.2.3 化学趋向性反应试验 采用改进的毛细管法进行化学趋向性反应试验^[10], 玻璃毛细管(内径为 0.5 mm)一端吸入人参总皂苷趋化待测液, 另一端用热熔胶封闭。将毛细管插入到含 500 μL 菌液的 1 mL 注射器中, 37℃下水平孵育

收稿日期: 2015-11-18

基金项目: 国家科技支撑计划(编号: 2011BAI03B01); 国家自然科学基金(编号: 31100239, 31200224, 31470420); 吉林省科技发展计划(编号: 20130206030YY, 20140520159JH)。

作者简介: 李 琼(1990—), 男, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物栽培研究。E-mail: wode17k@163.com。

通信作者: 许永华, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事药用植物栽培加工研究, E-mail: xuyonghua777@yeah.net; 张连学, 博士, 教授, 研究方向为药用植物栽培与加工, Tel: (0431) 84532952, E-mail: zlxbooksea@163.com。

60 min。用无菌水冲毛细管外壁以去除附着的菌液,折断毛细管后将内含物转入 EP 管中,加入 40 μL 无菌水稀释 3 倍,再将溶液吸出,均匀涂抹在固体平板上,反复操作 5 次。平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,统计单菌落的平均数。以单菌落的数量来衡量大肠杆菌和金黄色葡萄球菌化学趋向性的大小。

1.2.4 趋化指数的测定 趋化指数 = $(S - S_{\text{CK}}) / S_{\text{CK}}$ 。式中: S 为 2 种细菌对人参总皂苷的趋化参数; S_{CK} 为 2 种细菌相较于对照试验组的趋化参数。

1.2.5 不同浓度人参总皂苷对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响 将配置好的人参总皂苷溶液(12.500 0、1.250 0、0.125 0、0.0125 mg/L)按“1.2.3”节的方法进行趋化试验。

1.2.6 温度对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响 将 2 种细菌置于不同温度(25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$)下培养,按“1.2.3”节的方法进行趋化试验,其中培养大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的人参总皂苷浓度分别为 0.0125、0.125 0 mg/L。

1.2.7 pH 值对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响 分别将浓度为 0.0125、0.125 0 mg/L 的人参总皂苷溶液配制成不同的 pH 值(5、6、7、8),按“1.2.3”节的方法进行趋化试验,2 种细菌都在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。

1.2.8 培养时间对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响 将 pH 值为 7、浓度分别为 0.0125、0.125 0 mg/L 的人参总皂苷溶液设置不同培养时间(0、30、45、60、75 min),按“1.2.3”节的方法进行趋化试验,2 种细菌都在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。

1.2.9 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在最优趋化参数下对人参总皂苷的化学趋向性响应 综合筛选以上 4 种条件下趋化现象最为明显的试验参数,按“1.2.3”节的方法进行趋化试验。

1.2.10 数据分析 本试验均重复 5 次,试验数据取“平均值 \pm 标准差”。试验数据采用 Excel 2007 软件进行处理,利用 SPSS 18.0 中的单因素方差分析(One - Way ANOVA)结合 LSD 法对统计结果进行显著性方差分析。

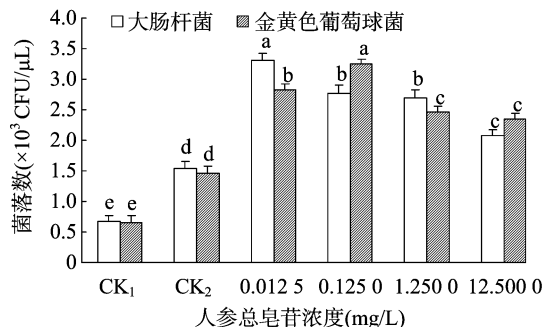
2 结果与分析

2.1 不同浓度人参总皂苷对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

如图 1 所示,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌分别对 4 种浓度的人参总皂苷表现出化学趋向性响应。其中,当人参总皂苷浓度为 0.0125 mg/L 时,大肠杆菌的化学趋向性最明显,而金黄色葡萄球菌则对 0.125 0 mg/L 浓度的人参总皂苷的化学趋向性最强,且二者都显著高于对照 1、对照 2 ($P < 0.05$),趋化指数分别为 3.891、1.155、3.929、1.206。随着溶液浓度的逐级递增,大肠杆菌的化学趋向性减弱,而金黄色葡萄球菌的化学趋向性先增强后减弱,呈现低浓度大于高浓度的趋势。

2.2 温度对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

如图 2 所示,当培养温度不同时,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对人参总皂苷都表现出敏感的化学趋向性,且 2 种细菌的化学趋向性都随温度的增加而增强。一个有趣的现象是,2 种细菌在培养温度为 25、30 $^{\circ}\text{C}$ 试验组中所表现出来的化学趋向性要显著低于 35、40 $^{\circ}\text{C}$ 试验组 ($P < 0.05$),而在培养温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 的试验组中,2 种细菌所表现出的化学趋向性最强、



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同

图1 不同浓度人参总皂苷对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

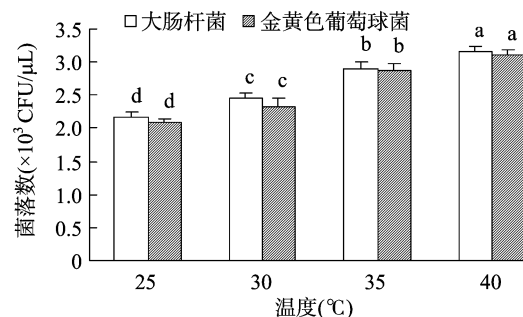


图2 温度对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

单菌落数量最多,且均显著高于其他试验组 ($P < 0.05$)。

2.3 pH 值对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

如图 3 所示,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对不同 pH 值的人参总皂苷培养液均表现出化学趋向性响应,但是随着 pH 值的逐渐增加,2 种细菌的化学趋向性都出现先增强后减弱的趋势。中性和偏碱性 (pH 值 = 7、8) 试验组的化学趋向性要明显强于酸性、偏弱酸性 (pH 值 = 5、6) 试验组 ($P < 0.05$),且都在 pH 值 = 7 时达到最大趋化值。结果显示,当 pH 值继续增加,不会增强 2 种细菌的化学趋向性响应,这可能与细菌生存的最适 pH 值存在一定的偶联关系。

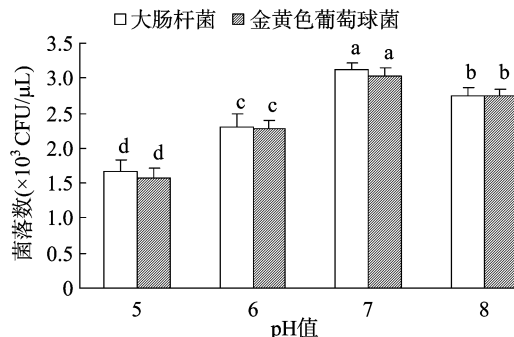


图3 pH值对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

2.4 培养时间对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

如图 4 所示,随着培养时间的延长,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对人参总皂苷的化学趋向性都呈现先增强后减弱的趋势,且都显著高于 0 min 试验组。其中,2 种细菌在培养 60、75 min 时的化学趋向性明显高于培养 30、45 min 试验组,尤其在 60 min 时的化学趋向性最强且显著高于其他试验组 ($P < 0.05$)。结果还表明,随着培养时间的进一步延长,2 种

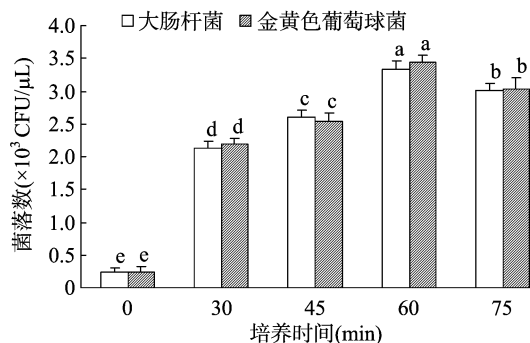


图4 培养时间对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌化学趋向性的影响

细菌的化学趋向性会受到一定的限制。

2.5 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在最优趋化参数下对人参总皂苷化学趋向性的响应

如图 5 所示,通过对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行不同人参总皂苷浓度、培养温度、pH 值及趋化时间条件下的化学趋向性研究发现,大肠杆菌对于浓度为 0.012 5 mg/L 的人参总皂苷,在 pH 值 = 7、培养温度为 40 ℃、培养时间为 60 min 的条件下达到最大趋化值,显著高于对照 1、对照 2 ($P < 0.05$),趋化指数分别为 3.868、1.075;而金黄色葡萄球菌则对浓度为 0.125 0 mg/L 的人参总皂苷在 pH 值 = 7、培养温度为 40 ℃、培养时间为 60 min 时达到最大趋化值,显著高于对照 1、对照 2 ($P < 0.05$),趋化指数分别为 3.755、1.175。由此看出,2 种模式细菌在最优趋化参数条件下对人参总皂苷都表现出较强的化学趋向性响应。

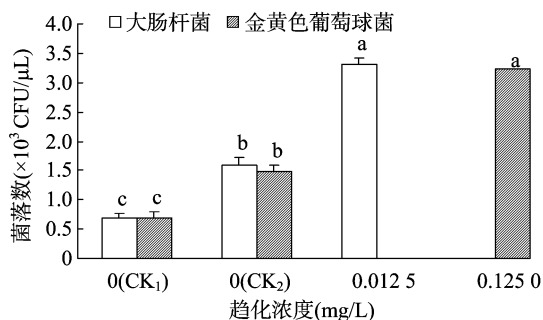


图5 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在最优趋化参数下对人参总皂苷的化学趋向性响应

3 结论与讨论

有报道指出,不同浓度下的人参根系分泌物不仅影响人参根际微生物的生长、繁殖及种群分布,而且分泌物中自毒性物质的浓度效应同样影响人参种子的萌发及幼苗生长^[11-17]。自然条件下次生代谢物质的浓度效应对于阐明化学趋向性具有重要意义,只有在特定的浓度下才能显示较强的化学趋向性响应。在本试验中,2 种模式细菌都对低浓度的人参总皂苷表现出较强的化学趋向性响应,但是随着浓度的增加而减弱。于是笔者推测,低浓度的人参根系分泌物可能会引起人参根际土壤微生物的化学趋向性响应,以至于改变微生物的群落结构,进而对人参的生长产生一定影响。

在自然界中,存在许多与植物生长代谢相关的微生物,且它们其中大部分都具有群体效应,如某些植物病原菌可利用

自身群体效应来调控对宿主植物根际的定殖过程及其致病性^[18-19]。然而人参根际土壤中的微生物是否存在群体效应,其作用机制又是什么,这种效应与人参根系分泌物及某些趋化性微生物之间又存在何种联系等还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 张重义,林文雄. 药用植物的化感自毒作用与连作障碍[J]. 中国生态农业学报,2009,17(1):189-196.
- [2] Qi J J, Yao H Y, Ma X J, et al. Soil microbial community composition and diversity in the rhizosphere of a Chinese medicinal plant[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2009, 40 (9/10):1462-1482.
- [3] 陈冬梅,柯文辉,陈兰兰,等. 连作对白肋烟根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 应用生态学报,2010,21(7):1751-1758.
- [4] 张重义,陈慧,杨艳会,等. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 应用生态学报,2010,21(11):2843-2848.
- [5] 林茂兹,王海斌,林辉锋. 太子参连作对根际土壤微生物的影响[J]. 生态学杂志,2012,31(1):106-111.
- [6] Zhou X, Wu F. p-Coumaric acid influenced cucumber rhizosphere soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. PLoS One, 2012, 7(10):1310-1315.
- [7] 张秋菊,张爱华,杨鹤,等. 人参皂苷对 4 种栽培作物早期根系发育的化感效应[J]. 植物分类与资源学报,2012,34(4):391-396.
- [8] Nicol R W, Yousef L, Traquair J A, et al. Ginsenosides stimulate the growth of soilborne pathogens of American ginseng[J]. Phytochemistry, 2003, 64(1):257-264.
- [9] 张爱华,雷锋杰,许永华,等. 人参皂苷对人参主要土传病害的化感作用[C]//中国植物保护学会植物化感作用专业委员会,中国海洋大学. 中国第四届植物化感作用学术研讨会论文摘要集. 青岛:中国植物保护学会植物化感作用学术委员会,2009:55.
- [10] O'toole R, Lundberg S, Fredriksson S A, et al. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(14):4308-4317.
- [11] 雷锋杰. 人参根系分泌物的化感作用研究[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [12] 张秋菊,耿艳秋,郁玉刚,等. 人参皂苷对人参幼苗生长发育的影响[J]. 中草药,2012(12):2503-2507.
- [13] 应益昕. 人参连作对土壤微生物群落的影响研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013.
- [14] 张鸿雁,薛泉宏. 人参连作障碍防治研究进展[J]. 江西农业学报,2010,22(6):68-71.
- [15] 张连学,陈长宝,王英平,等. 人参忌连作研究及其解决途径[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(4):481-485,491.
- [16] 杨靖春,张春丽,辛华,等. 老参地轮作不同年限的紫穗槐对人参土壤微生物区系的影响研究[J]. 东北师大学报(自然科学版),1985(2):101-109.
- [17] Walker T S, Bais H P, Déziel E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* - plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation[J]. Plant Physiology, 2004, 134(1):320-331.
- [18] Von Bodman S B, Bauer W D, Coplin D L. Quorum sensing in plant - pathogenic bacteria[J]. Phytopathology, 2003, 41(41):455-482.
- [19] Fray R G. Altering plant - microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing[J]. Annals of Botany, 2002, 89(3):245-253.