

文章编号: 1000-582X(2009) 11-1363-06

放射形土壤杆菌 GY04 胞外多糖发酵工艺 及其持水作用分析

李 静¹, 连 宾², 侯卫国²

(1. 太原理工大学 化学化工学院, 山西 太原 030024; 2. 中国科学院 地球化学
研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘 要: 从贵阳市郊区玉米地根际土样中分离筛选得到一株产胞外多糖的细菌 GY04 菌株, 其 16S rDNA 同源性分析表明该菌株为放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)。采用均匀设计原理对 GY04 菌株产胞外多糖的发酵工艺进行优化, 利用统计软件 SPSS(V 10.0) 分析, 得到 GY04 菌株产胞外多糖的最佳发酵工艺条件: 牛肉膏 2.000 g/L, 乙二醇 2.775 g/L, 碳酸钙 2.000 g/L, 初始 pH 值 7.000, 接种量 7.000%。在此发酵工艺条件下, 多糖产量达(2.683±0.600) g/L。将 GY04 菌株扩大培养制备成细菌持水剂, 实验条件下达到较好的持水效果。

关键词: 放射形土壤杆菌; 多糖; 发酵; 微生物持水剂

中图分类号: TQ929.2

文献标志码: A

Analysis of the extracellular polysaccharide's fermentation process and the water-retention ability of the *Agrobacterium radiobacter* GY04

LI Jing¹, LIAN Bin², HOU Wei-guo²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, P. R. China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, Guizhou, P. R. China)

Abstract: A bacterium strain, GY04, was isolated from sand soil of a maize field in suburb of Guiyang. The analysis of DNA sequence suggests that the strain of GY04 is *Agrobacterium radiobacter*. With the principle of the uniform design, the fermentation conditions of the strain GY04 are optimized. Analyzing by SPSS(V 10.0), the optimal fermentation process is determined. They are beef extract 2.000g/L, glycol 2.775 g/L, calcium carbonate 2.000g/L, the initial pH 7.000, the inoculum amount 7.000%. On these conditions, the production of the saccharide can be achieved the most, about (2.683±0.600) g/L. The results also show that bacterium *A. radiobacter* possess good water-retention ability as a microbial water-retaining agent.

Key words: *Agrobacterium radiobacter*; polysaccharide; fermentation; microbial water-retention agent

微生物胞外多糖(Extracellular Poly saccharide, EPS)是指微生物在生长代谢活动中分泌到细胞壁外

的多糖或多糖混合物, 它们也可依附于微生物细胞壁形成荚膜(Capsular Polysaccharides, CPS)或形成黏液

收稿日期: 2009-06-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 项目(2006CB403200); 国家自然科学基金资助项目(40463001)

作者简介: 李静(1981-), 女, 博士研究生, 主要从事环境微生物研究。

连宾(联系人), 男, 研究员, 博士生导师, (E-mail) bin2368@vip.163.com.

(Slime Polysaccharides, SPS)。微生物胞外多糖与其自身对环境的适应性以及构建特定的微环境有密切关系^[1-3]。近年来,越来越多的微生物多糖在生产 and 生活中发挥广泛的作用,如 Moon 等人^[4]研究的拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P)产生的胞外多糖 Pestan 每克可以吸附 120 mg Pb (II) 或 60 mg Zn (II);野油菜黄单胞杆菌产生的黄原胶是世界上生产规模最大、用途最广的微生物多糖,被广泛应用于食品、医药、采油、纺织、陶瓷、印染、香料、化妆品及消防等领域^[5]。一些低营养细菌(如芽孢杆菌)具有黏性荚膜或厚的果胶质外壁,能分泌大量黏液,这些具有黏性附属物的菌体和黏液能将矿物颗粒粘结,形成球状表面团聚^[6]。王进军等^[7]从黄土中分离得到 3 株富含多糖的细菌,研究表明这些细菌在土壤中具有明显持水效果,并认为其持水能力与其胞外多糖有密切关系,这为开展微生物胞外多糖在干旱土壤环境中的应用提供了可能。

众所周知,发生在中国西南地区的石漠化和北方的荒漠化是目前广受关注的环境问题,而缺水和干旱是造成以上环境问题的主要原因之一^[8-9]。涉足微生物持水作用的研究报道目前还很稀缺,但鉴于微生物个体微小、种类繁多、生长迅速和易于工业化培养等特性,探讨微生物及其胞外多糖在干旱环境土壤中的应用显然是非常必要的。

微生物产生胞外多糖受外界营养状况和环境条件的影响,其生物合成途径、产物种类及流变学特性、产量及产率与碳源、氮源、无机盐、pH 值、温度和通气状况等都有密切关系^[10-12],为有效利用微生物的胞外多糖,对 GY04 菌株的发酵条件进行了优化研究,并针对贵州喀斯特地貌地表水土流失问题,对微生物持水剂应用的可能性做了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种来源与分子鉴定

从贵阳市郊玉米地根际土样中分离筛选得到 GY04 菌株,并对其进行基于 16S rDNA 序列的细菌分子鉴定。

参照分子生物学实验指南的方法提取基因组 DNA。取 1.5 mL 对数期 GY04 菌株培养液离心(8 000 r/min, 2 min);沉淀加入 567 μ L 的 pH 8.0 的 TE 缓冲液,用吸管反复吹打使之重悬,加入 30 μ L 10% SDS 和 3 μ L 20 g/L 的蛋白酶 K,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;加入 100 μ L 5 mol/L 的 NaCl,充分混匀,再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液(50 g/L CTAB, 0.5 mol/L NaCl),混匀,65 $^{\circ}$ C 温育 10 min;

加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混匀,离心(10 000 r/min, 5 min)取上清;加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),离心(10 000 r/min, 5 min)取上清;重复这一步,直到上下层界面清楚,无蛋白在中间;加入 0.6 μ L 体积异丙醇轻轻混和离心(8 000 r/min, 2 min)得 DNA 沉淀,将 DNA 转移至一只新管,加入 1 mL 70% 乙醇洗涤,离心(8 000 r/min, 2 min);DNA 重悬于 100 μ L 的 TE 缓冲液中。

16S rDNA 的扩增引物为^[13]: A(5'-AACTGAAGAGTTTGTATCCTGGCTC-3')和 B(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系 50 μ L: 10 \times buffer 5 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 4 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L) 各 1 μ L, Taq 酶(5U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 33.75 μ L, 模板 4 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进入循环,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。扩增的 16S rDNA 纯化后由上海联合基因有限公司直接测序。测序引物与扩增引物相同。

从 Genbank 中调取土壤杆菌属(*Agrobacter*)及相近属菌株的 16S rDNA 序列用于系统发育学分析。16S rDNA 全序列用 ClustalX(1.8)软件包排序,用 MEGA 2 软件包中的 Kimura-Parameter Distance 模型计算进化距离,用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发生树,1 000 次随机抽样,计算自引导值(bootstrap)以评估系统发生树的置信度。

1.2 发酵培养基

蔗糖 5 g, 牛肉膏 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 0.3 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 5 g, FeCl₃ 0.005 g, 钾长石粉 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 18 g, pH 值自然, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.3 发酵终产物制备

采用摇瓶培养,改变碳源、氮源、钾长石粉添加量、碳酸钙添加量及培养条件进行试验。在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 液体培养基,灭菌后接种经活化过的菌悬液。在 120 r/min、28 $^{\circ}$ C 下摇瓶培养 5 d, 即得发酵终产物。

1.4 胞外多糖提取

取 GY04 菌株培养液,于 5 000 r/min 离心 20 min 去除沉淀,上清液在旋转真空蒸发器 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中浓缩 24 h 后,体积减少为原来的 1/3,加入 3 倍浓缩液体积的 95% 乙醇,4 $^{\circ}$ C 冰箱下静置 1 h,在 5 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,得到白色沉淀。再分别用无水乙醇、乙醚清洗沉淀,并

5 000 r/min 离心 10 min 得多糖粗品, 用 Sevag 试剂进行脱蛋白处理后, 得较纯的多糖制品^[14]。

1.5 发酵工艺优化

均匀设计法是中国独创的一种重大的科学实验方法, 将数论与实验设计成功地相结合, 适用于多因素多水平实验设计, 已广泛应用于生物、化工和制药

等领域^[15]。笔者以牛肉膏和乙二醇分别作为氮源和碳源, 钾长石粉与碳酸钙为混合辅助成分, 发酵液初始 pH 值与接种量为发酵条件, 对 GY04 菌株所产多糖发酵工艺进行优化。采用 $U_9(9^6)$ 实验设计, 9 组实验, 每组做 3 个重复发酵工艺优化参数如表 1, 实验设计见表 2。

表 1 发酵工艺优化参数

					g/L	
牛肉膏	乙二醇	钾长石粉	碳酸钙	初始 pH	接种量/ %	
1.500	2.775	0.800	0.200 0	7.000	5.000	
1.700	4.995	1.400	0.300 0	7.500	6.000	
2.000	7.215	2.000	0.400 0	8.000	7.000	

表 2 发酵工艺均匀设计表

						g/L
序号	牛肉膏	乙二醇	钾长石粉	碳酸钙	初始 pH	接种量/ %
1	1.500	2.775	1.400	0.300 0	8.000	7.000
2	1.500	4.995	2.000	0.200 0	7.500	7.000
3	1.500	4.995	0.800	0.300 0	7.000	6.000
4	1.700	7.215	2.000	0.200 0	7.000	6.000
5	1.700	2.775	0.800	0.400 0	8.000	6.000
6	1.700	2.775	1.400	0.200 0	7.500	5.000
7	2.000	4.995	0.800	0.400 0	7.500	5.000
8	2.000	7.215	1.400	0.300 0	7.000	5.000
9	2.000	7.215	2.000	0.400 0	8.000	7.000

1.6 微生物持水剂初步应用

1.6.1 土样选用及处理

选取贵阳市郊阿哈湖附近石漠化现象严重的一座石山上的风化沙土, 并将所采土样灭菌烘干备用。

1.6.2 微生物持水剂制备

按 7.000% 的接种量将 GY04 菌株接种到经改进的基础发酵培养液中, 28 °C 培养 1 d 后接种处理过的土样。

1.6.3 实验方案

用一次性塑料杯装 20 g 经处理的风化沙土, 加入 5 mL 细菌种子液(约为 5 g)使沙土含水量饱和, 设为初始重量 a (带杯质量), 此时为初始时间 A 。同时设置在 20 g 土样中加入灭菌的菌液和无菌水 2 个对照, 每个处理设 3 个重复, 分别置 28 °C 及 45 °C 温箱。间隔一段时间称量土样质量(带杯质量), 设为 b , 此时的测量时间设为 B 。以失水速率为指标, 绘制土样失水随时间的变化速率曲线。

1.6.4 土壤失水速率的测定

$$\text{失水速率} = \frac{a-b}{B-A}, \text{ 单位为 g/h.}$$

2 结果与讨论

2.1 细菌分子鉴定

用细菌通用引物扩增 GY04 的 16S rDNA 基因, 共 1 377 个碱基。将该序列与 Genbank 中相关数据进行相似性分析。结果表明, 菌株 GY04 与土壤杆菌属的部分菌株序列同源性较高(99%), 图 1 是该菌的系统发育树, 可以看出 GY04 菌株与放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*) 100% 的置信度聚在一起。

2.2 发酵工艺确定

以多糖产量为指标, 采用均匀设计法对 GY04 菌株产胞外多糖的发酵工艺进行优化, 以确定上述几个关键因素的最佳水平和发酵工艺的最佳参数。实验按表 2 的设计进行, 结果见表 3。

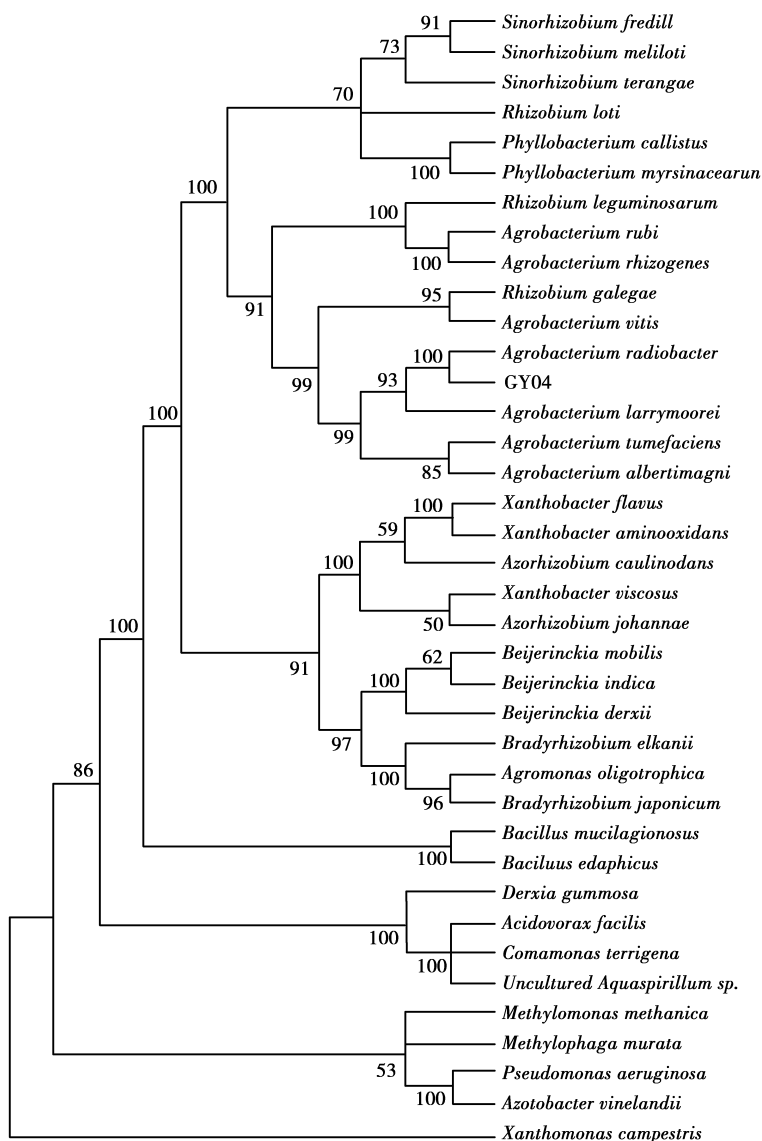


图 1 GY04 菌株的系统发育学地位

表 3 发酵工艺实验结果

g/L

实验号	牛肉膏	乙二醇	钾长石粉	碳酸钙	初始 pH	接种量/ %	多糖产量
1	1.500	2.775	1.400	0.300 0	8.000	7.000	1.256
2	1.500	4.995	2.000	0.200 0	7.500	7.000	1.581
3	1.500	4.995	0.800	0.300 0	7.000	6.000	1.468
4	1.700	7.215	2.000	0.200 0	7.000	6.000	1.667
5	1.700	2.775	0.800	0.400 0	8.000	6.000	1.359
6	1.700	2.775	1.400	0.200 0	7.500	5.000	1.524
7	2.000	4.995	0.800	0.400 0	7.500	5.000	1.686
8	2.000	7.215	1.400	0.300 0	7.000	5.000	1.896
9	2.000	7.215	2.000	0.400 0	8.000	7.000	1.733

经统计软件 SPSS(V 10.0) 分析钾长石粉这个因子对多糖产量而言为不显著因素, 剔除该因子, 得到回归方程:

$$Y = 0.223 + 1.835X_1 - 0.106X_2 - 0.083X_4 - 0.064X_5 + 0.029X_6, \text{ 线性相关系数 } R = 0.981, \text{ 经 } F \text{ 检验合格。}$$

根据线性回归方程: X_1 (牛肉膏) 2.000 g/L, X_2 (乙二醇) 2.775 g/L, X_4 (碳酸钙) 2.000 g/L, X_5 (初始 pH 值) 7.000, X_6 (接种量) 7.000% 时, Y 值 (多糖产量) 为 2.972 g/L 发酵液。

根据以上配方进行 3 次重复实验, 得到多糖产量为 (2.683 ± 0.600) g/L, 均高于设计实验 9 组的产量, 比基础发酵培养基产糖量 (1.532 ± 0.900) g/L 相比提高了 75.13%, 得到了在该条件下的最优发酵工艺。

2.2 持水作用效果与分析

将制成的生物持水剂加入经灭菌烘干的土样中, 分别置于 28 °C 与 45 °C 的温箱内。每间隔一段时间测量其质量, 利用 1.6.4 中给出的公式计算其失水速率, 结果见图 2、3。

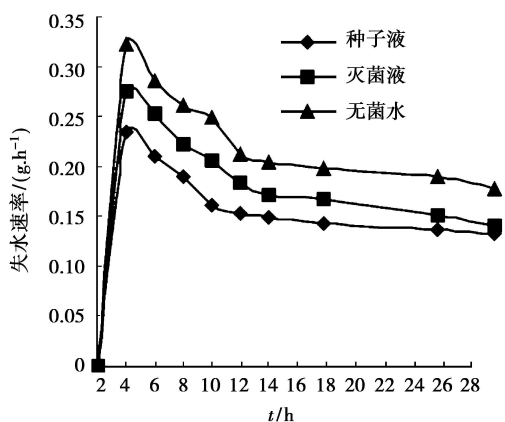


图 2 28 °C 下土壤的失水速率

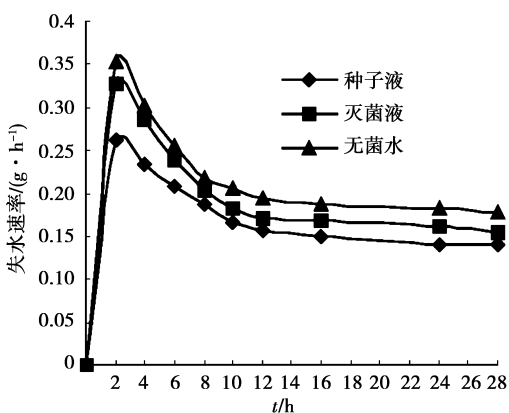


图 3 45 °C 下土壤的失水速率

结果表明: 在 28 °C 和 45 °C 下, 由 GY04 菌株所制成的微生物持水剂相对于灭菌的发酵液和无菌水的 2 个对照, 失水速率较低, 也即有明显的持水能力。但 45 °C 下的失水速率均高于 28 °C 下, 这可能是由于温度较高时, 水分的自然蒸发速率较大而造成的。

细菌培养液之所以能起到持水作用, 主要是因

为该菌株富含胞外多糖, 而糖类含有许多羟基等亲水性基团, 因而能吸附水分子, 达到保水的目的。土壤中存在种类及数量巨大的微生物, 其中细菌占绝大多数, 由细菌所产生的胞外多糖所带的羟基等亲水基团可以与浸透至土壤表面的水分子发生结合而形成微团聚体, 图 4 显示微生物胞外多糖可能的持水作用方式。土壤微团聚体的形成与土壤肥力以及土地利用状况有密切关系。

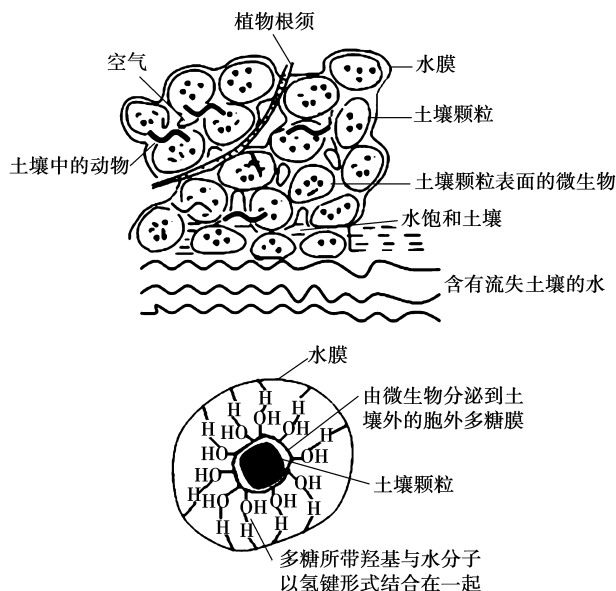


图 4 微生物胞外多糖的持水作用机理

贵州省地处中国西南喀斯特 (岩溶) 地区的中心地带, 分布着世界上面积最广、最为集中也最为典型的喀斯特景观^[16]。喀斯特地区地形奇特, 岩性特殊, 造壤能力低, 水土流失严重。因此, 如何在水土流失严重的石漠化地区, 充分利用有限的水分资源, 提高造林成活率、保存率, 促进林木生长, 恢复森林植被, 改善生态环境, 已成为亟待解决的重要问题^[17-18]。

近年来, 对喀斯特地貌的成土机制、土壤的演变规律及其危害已有了初步认识; 在此基础上, 大多数科研工作者认为水土保持是保护和提高土壤肥力的关键。微生物持水剂好似微型水库, 供树木根部缓慢吸收利用, 从而对不同树种的成活率及高生长量具有有益作用。微生物持水剂的菌种具有来源广泛、易培养、成本低和原材料易得等优点, 很适合用于改善土壤根部的微生态环境。充分利用微生物持水作用这一特性对帮助干旱缺水的喀斯特山区农业

和造林绿化具有实际意义。

3 结 语

通过均匀设计方法对发酵工艺进行优化,利用统计学软件SPSS10.0对结果进行分析,得到回归方程,并根据回归方程得到最佳发酵工艺条件:牛肉膏2.000 g/L,乙二醇2.775 g/L,碳酸钙2.000 g/L,初始pH值7.000,接种量7.000%,多糖产量达(2.683±0.600) g/L。将放射形土壤杆菌应用到保水剂领域,在实验条件下达到较好的持水效果。该菌株的持水能力与该菌株富含多糖的特性是分不开的。充分利用微生物持水作用这一特性对帮助干旱缺水的喀斯特山区农业和造林绿化具有实际意义。

参考文献:

- [1] 李静,连宾,胡鹏刚. 细菌多糖及其在食品工业中的应用[J]. 食品科学,2006,27(4):255-259.
LI JING, LIAN BIN, HU PENG-GANG. Bacterial polysaccharides and their applications in food industry[J]. Food Science,2006,27(4):255-259.
- [2] MONTGOMERY R. Development of biobased products[J]. Bioresource Technology,2004,91(1):1-29.
- [3] 旺达姆 E J, 贝特斯 S De, 斯泰因比歇尔 A. 生物高分子:第5卷,多糖I:原核生物多糖[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [4] MOON S H, PARK C S, KIM Y J, et al. Biosorption isotherms of Pb (II) and Zn (II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P[J]. Process Biochemistry,2006,41(2):312-316.
- [5] 崔艳红,黄现青. 微生物胞外多糖研究进展[J]. 生物技术通报,2006(2):25-28,42.
CUI YAN-HONG, HUANG XIAN-QIN. The advance in investigation of microbial extracellular polysaccharides[J]. Biotechnology Bulletin,2006(2):25-28,42.
- [6] GREENE R S B, CHARTRES C J, HODGKINSON K C. The effects of fire on the soil in a degraded semiarid woodland. I. Cryptogam cover and physical and micromorphological properties[J]. Australian Journal of Soil Research,1990,28(5):755-777.
- [7] 王进军,连宾,陈骏. 黄土中3株优势细菌的鉴定及保水模拟试验初步研究[J]. 农业环境科学学报,2007,26(4):1575-1578.
WANG JIN-JUN, LIAN BIN, CHEN JUN. Identification of three strains of predominate bacteria from loess and their water-retention ability in loess soil[J]. Journal of Agro-Environment Science,2007,26(4):1575-1578.
- [8] 黄钰铃,惠二青,李靖. 中国西南喀斯特地区石漠化成因及防治初探[J]. 地质灾害与环境保护,2006(1):1-4.
HUANG YU-LING, HUI ER-QING, LI JING. Causes and control measures of the rocky desertification in karsts areas in southwest of China[J]. Journal of Geological Hazards and Environment Preservation,2006(1):1-4.
- [9] 张平仓,丁文峰. 我国石漠化问题研究进展[J]. 长江科学院院报,2008,25(3):1-5.
ZHANG PING-CANG, DING WEN-FENG. Review on rock desertification research in China[J]. Journal of Yangtze River Scientific Research Institute,2008,25(3):1-5.
- [10] VILLEN A M A, IRANZO J U, GUNDLLAPALLI S B, et al. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*[J]. Enzyme and Microbial Technology,2006,39(2):229-234.
- [11] LEUNG M Y K, LIU C, KOON J C M, et al. Polysaccharide biological response modifiers[J]. Immunology Letters,2006,105(2):101-114.
- [12] CAI W, GU X, TANG J. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*[J]. Carbohydrate Polymers,2008,71(3):403-410.
- [13] KSIAZEK T G, ERDMAN D, GOLDSMITH C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. The New England Journal of Medicine,2003,348(20):1953-1966.
- [14] LIAN B, CHEN Y, ZHAO J, et al. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: Applications and mechanisms[J]. Bioresource Technology,2008,99(11):4825-4831.
- [15] WANG ZHAO-JING, LUO DIAN-HUI, ENA CAI. Optimization of polysaccharides extraction from *Gynostemma pentaphyllum Makino* using Uniform Design[J]. Carbohydrate Polymers,2007,69(2):311-317.
- [16] 龙健. 贵州喀斯特地区土壤障碍因素分析及其调控对策[J]. 土壤通报,2005,36(5):795-798.
LONG JIAN. Soil restrictive factors analysis and countermeasures in Guizhou Karst region[J]. Chinese Journal of Soil Science,2005,36(5):795-798.
- [17] 李阳兵,王世杰,容丽. 关于中国西南石漠化的若干问题[J]. 长江流域资源与环境,2003,12(6):593-598.
LI YANG-BING, WANG SHI-JIE, RONG LI. Problems of Karst rocky desertification in southwest China[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin,2003,12(6):593-598.
- [18] 梁亮,刘志霄,张代贵,等. 喀斯特地区石漠化治理的理论模式探讨[J]. 应用生态学报,2007,18(3):595-600.
LIANG LIANG, LIU ZHI-XIAO, ZHANG DA-GUI, et al. Theoretical model for rocky desertification control in Karst area[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2007,18(3):595-600.

(编辑 张 苹)