

低营养物浓度培养基分离淀粉酶分泌细菌及其特性的初步研究

代先祝

(西南大学资源环境学院,重庆 400715)

摘要: 采用不经过富集培养直接将土壤稀释涂布于营养物浓度较低的 1/10 LB 固体培养基上,常温培养,然后转接至加淀粉的 1/10 LB 固体培养基,用碘液初步检测淀粉酶分泌情况的方法,从土壤中分离出了 5 株能分泌淀粉酶的细菌,分别命名为 K-1、K-2、K-3、K-4、K-5。并对其不同 pH 值、温度条件下的生长情况及分解淀粉产生还原糖的情况进行了初步研究。结果表明,菌株 K-2 具有产耐酸碱淀粉酶活性,在 pH4~10 范围内均可分解淀粉产生还原糖;K-4 具有产低温淀粉酶活性,4℃能分解淀粉;K-5 具有产高温耐碱淀粉酶活性。研究结果表明,采用低营养物浓度能从土壤中获得丰富多样的淀粉酶分泌细菌,为从自然环境中获取更丰富多样的微生物资源提供了基础参考。

关键词: 低营养物浓度培养基; 细菌多样性; 耐性淀粉酶

中图分类号:Q93-3;Q814;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)11-0026-04

Research on the Isolation of Amylase-secreting Bacteria from Soil by Culture Mediums with Low-concentration of Nutrients & Its Characteristics

DAI Xianzhu

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In the experiment, diluted soil samples were directly plated onto culture mediums with low concentration of nutrients (1/10 diluted LB solid culture medium) and cultivated at room temperature instead of enrichment culture, then it was plated onto 1/10 diluted LB solid culture medium with starch addition, and the secretion of amylase was determined by adding iodine solution to the surroundings of bacterial colonies to observe if it became blue, and 5 amylase-secreting bacteria strains were finally isolated and named as K-1, K-2, K-3, K-4, and K-5. The effects of different pH value and different temperature on their growth and their amylase hydrolysis status were investigated. The results showed that strain K-2 had acid & alkali-resisting amylase activity and it could achieve amylase hydrolysis in wide range of pH (pH4~10), and strain K-4 had activity at low temperature (it could achieve amylase hydrolysis at 4℃), and strain K-5 had alkali-resisting amylase activity at high temperature. The results of our study suggested that various amylase-secreting bacteria could be obtained from soil by culture mediums with low concentration of nutrients, which provided experimental base for obtaining more microbial resources form natural environment.

Key words: low nutrient medium; bacteria biodiversity; tolerant Amylase

土壤微生物的物种多样性是指土壤生态系统中微生物的物种丰富度和均一度,这是微生物多样性的最直接表现形式。根据原位的、不经培养的微生物系统发育学研究发现,自然界中 95%~99% 的微生物种群尚未被分离培养或描述,从而推算地球上仅细菌就有 10 万~50 万种^[1-2]。通过改善培养基种类和培养条件,最大限度地分离和培养各类微生物,不但有助于了解土壤中的微生物种群,也是充分开发土壤中微生物资源所必需的^[3]。

淀粉酶是最早用于工业生产并且是用途最广、产量最大的酶制剂产品之一。淀粉酶种类繁多,特点各异,可应用于酿造、食品加工、工业副产品及废料的处理等多种领域^[4]。由于微生物数量多、繁殖快,工业生产主要采用微生物发酵法大量生产微生物制剂^[4]。工业的发展对淀粉酶的活性及使用条件提出了越来越高的要求,如在某些制造行业,使用具有高活性、耐高温、耐极限酸碱环境等特性的淀粉酶,将获得很高的经济效益。长期以来为获

基金项目:重庆市自然科学基金“未培养微生物培养技术在分离降解有机污染物微生物资源中的应用研究”(No.CSTC 2008BB7095)。

收稿日期:2011-09-06

作者简介:代先祝(1978-),女,在读博士,讲师,从事环境微生物学研究。

优先数字出版时间:2011-10-12;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111012.1012.002.html?uid=>。

得更高活性的淀粉酶,主要是使用分子生物学手段对现有酶进行结构分析和定向改造^[5],使用相似的研究手段能获得活性更高的酶类的可能性变得越来越小。因此,研究分离培养分泌新的淀粉酶微生物具有重要意义。

有研究表明,使用低浓度培养基能从土壤分离得到以前未能分离培养的新的微生物种类,而且土壤中也存在以前认为只在极端环境下才存在的极端环境微生物^[2]。Ce dric F.V.^[8]等采用低营养物浓度的培养基富集培养温泉中的微生物后,发现能检测到新的淀粉酶基因。在从土壤中分离资源性微生物时,通常采用的是高营养物浓度培养基,这可能导致不能分离出很多在高营养浓度下生长较慢或者不生长的细菌^[9]。因此,本文采用直接将土壤稀释涂布较低营养物浓度固体培养基的方法,从土壤中分离能分泌淀粉酶的细菌,并对分离的细菌的淀粉水解活性进行了初步研究,旨在为建立和完善从土壤中分离新的资源性微生物的方法提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

恒温培养振荡器:ZHWY-211B型,上海智城分析仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅:YXQ-SG41-280,四川射洪医疗器械厂;培养箱:PQX型,宁波莱福科技有限公司;恒温水浴锅:HH-4,江苏金坛市宏华仪器厂;台式离心机:Allegra X-22R,Beckman;紫外可见分光光度计:SP-722UV型,上海光谱仪器有限公司。

1.1.2 主要试剂及培养基

碘-碘化钾溶液:称取碘 0.1 g,碘化钾 0.2 g,先将碘化钾溶于少量水中,然后再将碘溶于碘化钾溶液中,最后加水至 100 mL,棕色试剂瓶中保存备用。

3,5-二硝基水杨酸试剂:精确称取 3,5-二硝基水杨酸 1 g,溶于 20 mL 2 mol/L NaOH 溶液中,加入 50 mL 蒸馏水,再加入 30 g 酒石酸钾钠,待溶解后用蒸馏水定容至 100 mL,密封保存备用。

标准麦芽糖溶液(1 mg/mL):精确称取 100 mg 麦芽糖,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL。

LB 培养基(Luria-Bertani):蛋白胨粉 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,去离子水 1000 mL,pH7.0。

LB/10 培养基:将 LB 培养基稀释 10 倍,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,取出备用。

固体培养基在灭菌之前加入 20 g 琼脂粉。

分离培养基和淀粉水解效果检测培养基中均加入 0.5 %的可溶性淀粉。

1.2 检测方法

分离过程中淀粉酶活性检测:利用淀粉被分解前遇碘液变蓝色、分解后不变色的特点,在固体培养基上生长的细菌菌落周围直接滴加碘液观察。

还原糖活性测定方法:标准曲线的制作,取 25 mL 刻度试管 7 支,编号。分别加入麦芽糖标准液(1 mg/mL) 0、0.2 mL、0.6 mL、1.0 mL、1.4 mL、1.8 mL、2.0 mL,然后用吸管向各管加蒸馏水使溶液达 2.0 mL,再各加 3,5-二硝基水杨酸试剂 2.0 mL,置沸水浴中加热 5 min。取出冷却,用蒸馏水稀释至 25 mL。混匀后,用分光光度计在 520 nm 波长下进行比色,记录吸光度。以吸光度为纵坐标,麦芽糖含量(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。样品与标准溶液一起测定吸光度,然后根据标准曲线计算出还原糖的浓度。每次测定样品时都同时制作还原糖标准曲线。

细菌在液体培养基中的生长:比浊法,即测定菌液在 600 nm 波长下的吸光值,菌液浓度太高时用 0.9 %氯化钠溶液稀释后测定。

1.3 实验步骤

1.3.1 采样

考虑到肥沃土壤中细菌数量过大,采用平板稀释涂布法在较高稀释倍数时只能分离到在土壤中数量多的细菌,而稀释倍数过低又会导致细菌数量过多,无法观察。故本试验挑选了贫瘠土壤做为分离样品。在校园中有植被的地方选取 5 个不同地点,铲去表层 2~5 cm 的表层土,采集土样,装入无菌纸袋中,使用前将 5 个不同地点采集的土壤充分混匀后使用。

1.3.2 菌种的分离

土壤样品直接稀释涂布法:称取土壤 10 g,倒入 90 mL 无菌生理盐水中,25 °C 摇床上振荡 10 min,取出,分别吸取 0.1 mL 土壤悬液直接涂布 LB(对照)和 LB/10 固体培养基各 6 个。涂布后的平皿在超净工作台中放置 15 min,待涂布的溶液充分吸附后分别将两种培养基的各 3 个平皿倒置于 25 °C 和 37 °C 培养。培养 24 h 后,观察细菌生长情况。拍照记录菌体生长情况,根据菌体形态初步判断种类,用灭菌牙签挑取具有不同形态的菌落转接到添加了 0.5 %淀粉的 LB 和 LB/10 固体培养基,然后在相应温度下培养,同一个菌落分别转接 2 个平板,一个用于碘液检测是否有淀粉酶活性,一个用于对有淀粉酶活性的菌进一步划线分离纯化。同一个菌至少在固体培养基上划线 3 次,菌落形态均一,并用显微镜检测菌体形态是否一致。

1.3.3 不同温度对分离菌株的生长及分解淀粉情况

挑取待测菌株的单菌落接种于 5 mL 1/10 LB 液体培养基,25 °C,140 r/min,振荡培养 24 h,作为种子菌液,以保证接种量的均一性。将该菌液以 1 %的接种量转接到加有 0.5 %可溶性淀粉的 5 mL 1/10 LB 液体培养基中,分别置于 4 °C、18 °C、25 °C、37 °C、45 °C,140 r/min 条件下振荡培养 24 h。间隔一定时间测 OD₆₀₀,判断细菌生长情况。然后将在最适温度、pH7 条件下培养的菌液离心取上清液,用于测定在各个温度条件下的酶活力。测定

结果根据麦芽糖标准曲线换算成麦芽糖浓度后,减去各培养基未接种的对照管中测定出来的背景值,并以所测定条件下的最高活力为 1,其他样品用最高活力校正为相对活力。

1.3.4 不同 pH 值对分离菌株的生长及分解淀粉情况

用 NaOH 和 HCl 溶液调整加有 0.5% 可溶性淀粉的 1/10 LB 液体培养基的 pH 值,分别调至 4.0、5.0、6.8、8.5、10.0,然后高压蒸汽灭菌备用。考虑到空气中的二氧化碳融入溶液中会改变碱性培养基的 pH 值,这部分实验的培养基都需在使用时现配即用。以 1% 的接种量接种种子菌液(同 1.3.3),然后于 25 °C,140 r/min,振荡培养 24 h。培养后菌液处理同 1.3.3。

2 结果与讨论

2.1 淀粉酶分泌菌株的分离

同样的土壤分离样,在不同温度和不同营养物浓度的培养基上生长的菌落。从形态上初步判断存在明显的差异(图 1)。在 LB 培养基,37 °C 条件下培养的平板上以一种菌落扁平、表面粗糙的细菌为主,从菌落形态上初步判断有 3 种菌;25 °C 条件下培养的平板细菌有 6 种,没有出现某一种细菌占据主要生长优势的现象。可见这种差别主要可能由于在 37 °C 条件下,一种细菌的生长速度过快,迅速占据了固体培养基的生长表面,导致其他细菌无法生长。在 1/10LB 培养基上,37 °C 条件下培养的平板上也没有出现一种细菌种类占生长优势的现象,有 7 种不同形态的菌落;25 °C 条件下培养的固体培养基上的菌落种类和在 37 °C 条件下的 1/10LB 培养基上菌落种类又存在明显差别,但是,两种温度下细菌种类并没有差别,都是 7 种。该实验结果再次证明,高营养物浓度培养基确实因为对某些快速生长细菌存在选择性,导致能分离培养的细菌丰富度降低。

将在 25 °C 和 37 °C 条件下培养的 1/10LB 培养基上的细菌转接到添加了淀粉的培养基。通过碘液检测后挑取透明圈较大的菌落,分离出了 5 株分泌淀粉酶的细菌,分别命名为 K-1、K-2、K-3、K-4、K-5。

各菌株的菌体特征及培养特征如下:

K-1: G^+ , 长杆菌, 链状排列, 1/10LB 固体培养基 25 °C 培养 48 h 后,其菌落呈扁平、白色,不透明,菌落直径约 1 cm。

K-2: G^+ , 菌体呈分枝状、排列不规则, 1/10LB 固体培养基 25 °C 培养 48 h 后,其菌落呈扁平、白色,不透明,边缘不整齐,菌落直径约 2 cm。

K-3: G^+ , 杆菌, 1/10LB 固体培养基 25 °C 培养 48 h

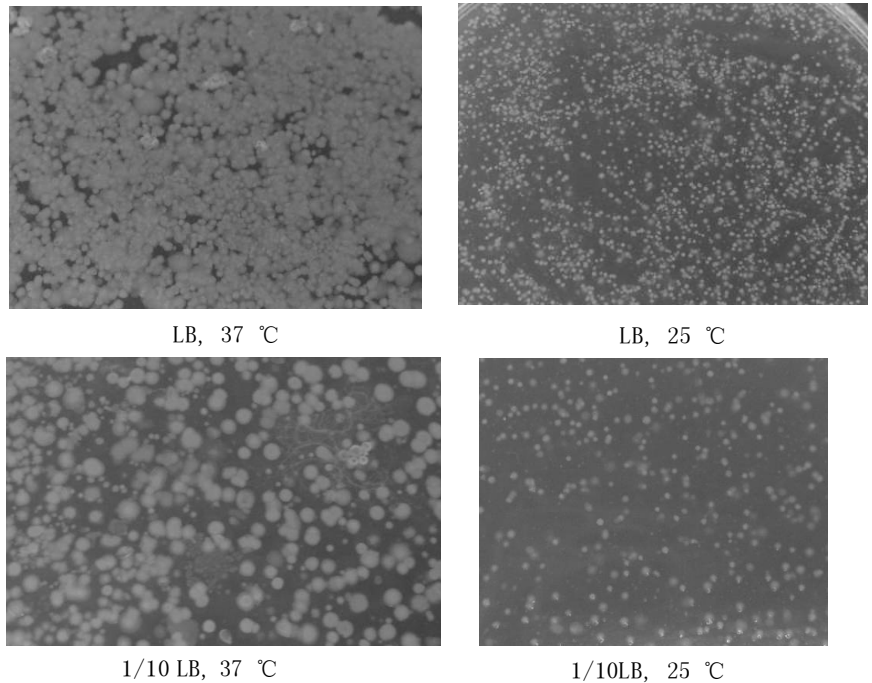


图 1 在不同温度和不同培养基上生长的细菌

后,其菌落呈扁平,中间略微突起,中央白色,边缘半透明,菌落直径约 3 cm。

K-4: G^- , 小杆菌, 1/10LB 固体培养基 25 °C 培养 48 h 后,其菌落呈淡黄色,扁平,中间略突起,表面粗糙,菌落直径约 1.5 cm。

K-5: G^+ , 杆菌, 1/10LB 固体培养基 25 °C 培养 48 h 后,其菌落呈圆形,突起,边缘整齐,粘稠,菌落直径约 1 cm。

2.2 不同温度对分离菌株生长的影响及分解淀粉情况

测定了各菌株在 4 °C、18 °C、26 °C、37 °C、45 °C 培养 24 h 后,菌液在 600 nm 处的吸光值,结果见图 2。

从图 2(A)中可以看出:K-1 能在 18~37 °C 生长,26 °C 生长最好;K-2 能在 18~37 °C 生长,37 °C 生长最好;K-3 在 26~37 °C 生长;K-4 能在 18~37 °C,37 °C 生长最好;K-5 能在 18~45 °C 生长,37 °C 生长最好。

测定各温度条件下的酶活力,结果见图 2。从图 2(B)中可以看出:K-1 与 K-2 在 18~37 °C 时酶活力较强;K-3 分解淀粉酶在 26~27 °C 时活力较高;K-4 在 4 °C 也有分解活性,最适温度为 26 °C;K-5 分解产还原糖的浓度随着温度升高而增加。从该部分实验结果来看,K-5 最有可能产高温淀粉酶。

2.3 不同 pH 值对各菌株生长及水解淀粉的影响情况

测定了各菌株分别在 pH 值为 4.0、5.0、6.8、8.5、10.0 的培养基中的生长情况,测定培养 24 h 后菌液在 600 nm 处的吸光值,结果见图 3(A)。

从图 3(A)中可以看出:K-1 能在 pH5.0~8.5 范围内生长,pH5.0 时生长最好;K-2 能在 pH6.8~8.5 范围内生长;K-3 能在 pH5.0~8.5 内生长,pH5.0 时生长最好;K-

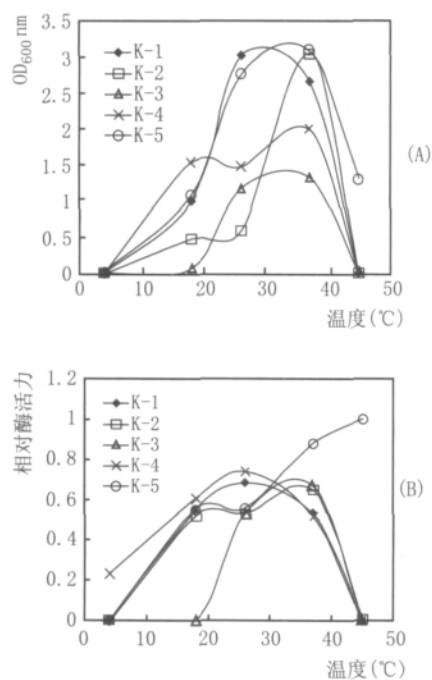


图2 各菌株生长温度范围(A)及其分泌淀粉酶在相应条件下的相对活力(B)

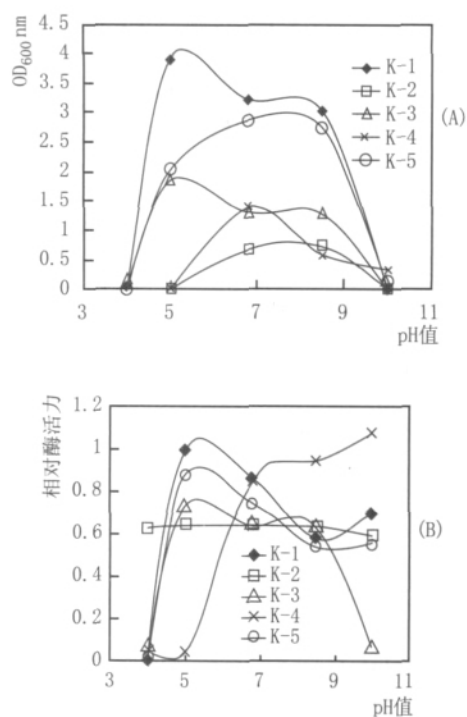


图3 各菌株的生长pH范围(A)及其分泌淀粉酶在相应条件下的相对活力(B)

4 能在 pH5.0~10 范围内生长,pH6.8 时生长最好;K-5 能在 pH5.0~8.5 范围内生长,pH6.8 时生长最好。

同时也测定了各 pH 值条件下各菌分泌的淀粉酶活性,结果见图 3(B)。从图 3(B)中可以看到:K-1 在 pH5.0~10 都能水解淀粉;K-2 能在 pH4.0~10 水解淀粉;K-3 能在 pH5.0~8.5 水解淀粉;K-4 能在 pH6.8~10 水解淀粉,且活性随 pH 值增加而升高;K-5 能在 pH5.0~10 水解淀粉,在该范围内淀粉酶活性相当。以上结果表明,K-2 分泌的淀粉酶具有较广的酸碱抗性,K-4 产生的淀粉酶可能是耐碱性淀粉酶,K-5 产生的淀粉酶具有耐高温耐碱性性能。

3 结论及展望

从土壤中分离获得了 5 株淀粉酶产生菌株,并对这些菌株在不同温度和 pH 值条件下的生长情况及其分泌的淀粉酶酶活进行了初步研究。研究结果表明,采用相对较低营养物浓度培养基,不同的培养温度,能分离更多种类的细菌,为建立从土壤中分离更多的微生物资源方法提供了基础参考。

考虑到实际应用,本文主要培养的是能快速生长的细菌,对其生理特性进行了初步研究,从发现新的分泌淀粉酶细菌的目标来说还远远不够。将来可以对分离的 5 株菌所分泌的淀粉酶做更深入的研究,以确认淀粉酶的种类及其与已知淀粉酶类的差异等。从分离方法上可以进一步改进的地方有:①可以使用更低营养物浓度培养基,添加真菌抑制剂,长时间培养(7 d 以上);②除了营养

物浓度和温度,还可以改变其他培养条件,如不同 pH 值和氧浓度。

参考文献:

- [1] 阎章才,东秀珠.微生物的生物多样性及应用前景[J].微生物学通报,2001,28(1):96-102.
- [2] Shayne J. Joseph, Philip Hugenoltz, Parveen Sangwan et al. Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria [J].Appl. Environ. Microbiol., 2003, 72:10-7215.
- [3] 焦瑞身.新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养[J].生物工程学报,2004,20(5):641-645.
- [4] 谷军.α-淀粉酶的生产与应用[J].生物技术,1994,4(3):1-5.
- [5] 柯涛.α-淀粉酶基因体外定向进化的研究[D].郑州:河南农业大学,2003.
- [6] 张双民.土壤中淀粉酶高产菌株的分离及产酶条件的优化[J].土壤肥料,2006(2):59-61.
- [7] 吴松刚.类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶的研究[J].微生物学报,1997(1):32-39.
- [8] Tabacchioni S chiarini L, et al. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population [J]. Microbial Ecology. 2000, 40: 169-1761.
- [9] Ce dric F.V. Hobel et al. Use of low nutrient enrichments to access novel amylase genes in silent diversity of thermophiles [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2004, 20: 801-809.