



一株高产胞外多糖巨大芽孢杆菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其对土壤团聚体的影响

刘丙花¹, 丁延芹², 刘方春¹, 刘幸红¹, 马胜国³, 彭琳¹, 孙铭婕¹,
于连家¹, 马海林^{1*}

1 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014

2 山东农业大学 生命科学学院, 山东 泰安 271018

3 山东省林业保护和发展服务中心, 山东 济南 250014

刘丙花, 丁延芹, 刘方春, 刘幸红, 马胜国, 彭琳, 孙铭婕, 于连家, 马海林. 一株高产胞外多糖巨大芽孢杆菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其对土壤团聚体的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3968-3979.

LIU Binghua, DING Yanqin, LIU Fangchun, LIU Xinghong, MA Shengguo, PENG Lin, SUN Mingjie, YU Lianjia, MA Hailin. Screening, identification, fermentation condition optimization of an exopolysaccharide-producing strain and the influence on soil macro-aggregate formation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3968-3979.

摘要:【目的】筛选具有高产胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)特性的微生物菌株, 为功能性土壤改良菌剂的研制提供菌种资源。【方法】采用 LB-苯胺蓝平板结合菌丝拉丝法定性筛选获得具有产 EPS 特性的植物根际促生细菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)功能菌株; 采用低温醇沉分离、硫酸-萘酚比色法测定 PGPR 功能菌株经 4 种培养基发酵后发酵液中 EPS 含量, 获得具有高产 EPS 特性的 PGPR 功能菌株; 以发酵液中 EPS 含量为衡量指标, 采用正交试验对高产 EPS 菌株发酵条件进行优化; 采用培养皿土壤培养试验, 分析 F1 发酵液对砂壤土土壤大团聚体含量的影响。【结果】初选获得 8 株具有产 EPS 特性的 PGPR 功能菌株; 经复选确定菌株 F1 具有高产 EPS 特性, PDA 是 F1 产 EPS 的最优培养基, EPS 含量为 867.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。基于形态学、生理生化特性测定, 以及 16S rRNA 基因序列系统发育分析、全基因组平均核苷酸相似度分析, 确定 F1 为一株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。F1 产 EPS 的最优培养条件: 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h, 在该条件下 EPS 产量为 1 123.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。F1 应用于砂壤土进行土壤培养 40 d 后, 粒径 >0.25 mm

资助项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010804); 2024 年中央财政林业科技推广示范项目; 济南市科技型中小企业创新能力提升工程项目

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (Major Scientific and Technological Innovation Project) (2021CXGC010804), the 2024 Central Finance Forestry Technology Promotion Demonstration Project, and the Innovation Ability Improvement Project of Small and Medium-sized Technology-based Enterprise of Jinan.

*Corresponding author. E-mail: mahlin@163.com

Received: 2024-04-25; Accepted: 2024-07-22; Published online: 2024-07-24

土壤水稳性大团聚体含量比对照提高了 4.44 倍。【结论】F1 菌株具有较强的产 EPS 能力, 能够促进砂壤土水稳性大团聚体的形成; F1 产 EPS 最优培养基为 PDA, 最优发酵条件为 28 °C、180 r/min 培养 24 h。

关键词: 胞外多糖; 巨大芽孢杆菌; 产胞外多糖发酵条件; 土壤团聚体

Screening, identification, fermentation condition optimization of an exopolysaccharide-producing strain and the influence on soil macro-aggregate formation

LIU Binghua¹, DING Yanqin², LIU Fangchun¹, LIU Xinghong¹, MA Shengguo³, PENG Lin¹, SUN Mingjie¹, YU Lianjia¹, MA Hailin^{1*}

1 Shandong Academy of Forestry, Jinan 250014, Shandong, China

2 College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

3 Shandong Forestry Protection and Development Service center, Jinan 250014, Shandong, China

Abstract: [Objective] To screen microbial strains with high production of exopolysaccharides (EPS) and provide strain resources for the development of soil improvement agents. [Methods] The string test with a LB-aniline blue plate was employed to qualitatively screen the strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with EPS production. After fermentation with each strain in four media, the EPS content in the fermentation liquid was determined by low temperature alcohol precipitation and the sulfate-anthranone colorimetric method, on the basis of which the PGPR strain with high EPS production was screened out. The fermentation conditions of the strain screened out were optimized by orthogonal test with EPS content in fermentation liquid as the indicator. The influence of the fermentation liquid of strain F1 on the content of macro-aggregates in sandy loam soil was analyzed by the petri dish culture experiment. [Results] Eight EPS-producing PGPR strains were primarily screened out, among which strain F1 had the highest EPS production. PDA was the best medium for F1 to produce EPS, with the EPS content of 867.54 µg/mL. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence, and also average nucleotide identity analysis, F1 was identified as a strain of *Bacillus megaterium*. The optimal culture conditions for F1 to produce EPS were 28 °C and 180 r/min for 24 h, under which the EPS yield reached 1 123.39 µg/mL. After F1 was incubated in sandy loam soil for 40 days, the content of water-stable macro-aggregates with the grain diameter >0.25 mm in the soil increased by 4.44 times compared with that of the control. [Conclusion] Strain F1 with high EPS production can promote the formation of water-stable macro-aggregates in sandy loam soil. The optimal conditions for F1 to produce of EPS was incubation in PDA at 28 °C and 180 r/min for 24 h.

Keywords: exopolysaccharides; *Bacillus megaterium*; fermentation conditions for exopolysaccharide production; soil aggregate

微生物胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是一些特殊微生物生长代谢过程中分泌到细胞壁外或结合在细胞表面的水溶性生物大分子物质,能够促进土壤大团聚体的形成和维持其稳定性,具有改善土壤特性、提高植物抗逆性、吸附重金属等复合效应,而且环境友好,在土壤环境修复及农业生产中具有良好的应用前景^[1-5]。自然界中,能够合成多糖的微生物种类繁多,如细菌、真菌、放线菌均能合成多糖,其中细菌在土壤中的占比达70%–90%,常见的能够产多糖的细菌属有土壤杆菌属、固氮菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属等^[6-9]。植物根际促生细菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是指能够在植物根际持续稳定定殖,对植物生长、生理代谢和环境适应等方面起到积极作用的有益细菌。从PGPR中筛选具有高产EPS特性的细菌,研制PGPR复合功能菌剂,对促进农业可持续发展有重要意义。

近年来,作者所在单位在功能PGPR菌株的筛选、鉴定及菌剂化应用方面取得了突出成绩,从滨海盐碱地分离获得一批具有促生、抗逆、土壤修复等复合效应的功能PGPR菌株。本研究对山东省东营市孤岛镇刺槐林场刺槐林根际土壤分离的PGPR菌种,采用LB-苯胺蓝平板结合菌丝拉丝法定性筛选具有产EPS性质的菌株;随后,采用低温醇沉分离、硫酸-萘酮比色法测定初筛菌株EPS产量,筛选高产EPS菌株,并对其进行形态学、生理生化特性和分子学鉴定;以发酵液中EPS含量为衡量指标,对其产EPS发酵条件进行优化,以期为功能性土壤改良菌剂的研制提供菌种资源及其后期的推广应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

试验所用菌种均分离自山东省东营市孤岛镇刺槐林场刺槐林根际土壤,保存于山东农业大学生命与科学学院PGPR-植物相互作用研究室菌种资源库。

1.1.2 培 养 基

LB-苯胺蓝培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,苯胺蓝 5.0,琼脂粉 15.0, pH 7.0。121 °C灭菌 20 min。

PDA培养基(g/L):土豆 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 15.0, pH 7.0。115 °C灭菌 20 min。

LB培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,琼脂 15.0, pH 7.0。121 °C灭菌 20 min。

NA培养基(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉膏 3.0,氯化钠 5.0,琼脂 15.0, pH 7.0。121 °C灭菌 20 min。

葡萄糖-酵母粉培养基(g/L):葡萄糖 50.0,酵母粉 5.0,氯化钙 3.0,琼脂 15.0, pH 7.0。115 °C灭菌 20 min。

1.2 菌 株 筛 选

1.2.1 初 筛

采用LB-苯胺蓝平板结合菌丝拉丝法定性筛选具有产EPS性质的菌株。将菌种资源库中由甘油管保藏的菌株在LB培养基上活化;挑取单菌落接种于LB-苯胺蓝筛选培养基上,置于恒温恒湿培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司)37 °C条件下培养24 h后,观察筛选培养基上菌体形态。将平板上菌体被水溶性苯胺蓝浸润,呈蓝色液滴状且采用灭菌牙签挑起时能拉丝的菌株认定具有产EPS性质。

1.2.2 复 筛

采用低温醇沉分离、硫酸-萘酮比色法定

初筛菌株 EPS 产量, 筛选高产 EPS 菌株。将初筛获得的菌株从甘油管中接种到 LB 液体培养基中, 置于恒温振荡器(常州市国旺仪器制造有限公司) 37 °C、180 r/min 培养 24 h 获得种子液。种子液经 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体并重悬于生理盐水中。以空白生理盐水为对照, 将菌悬液 OD_{600} 调整到 1.0。将体积分数为 1.0% 的菌悬液分别接种到 LB、PDA、NA 和葡萄糖-酵母粉液体培养基中, 置于恒温振荡器(常州市国旺仪器制造有限公司) 37 °C、180 r/min 培养 48 h 获得细菌发酵液。依据单位发酵液中 EPS 含量高低筛选具有高产 EPS 特性的菌株。

1.3 EPS 提取及测定

采用低温醇沉分离法提取发酵液 EPS^[10]。将复选菌株发酵液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移到新离心管中。上清液置于沸水中水浴 10 min, 使蛋白质变性, 自然冷却后在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 去蛋白, 保留上清液。取 2.0 mL 上清液, 加入 6 mL 的预冷的无水乙醇, 放置在 4 °C 条件下低温萃取 24 h, 使 EPS 充分析出。将析出 EPS 的上清液在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 去除上清液, 保留 EPS 沉淀; 将含有 EPS 沉淀离心管置于烘箱中 50 °C 烘干, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

采用蒽酮-硫酸法测定 EPS 含量^[11]。将提取的 EPS 样品溶解于 1.0 mL 蒸馏水中, 充分振荡混匀; 吸取 0.2 mL 于洁净试管中, 用蒸馏水补充到 2.5 mL, 混匀后加入 5.0 mL 硫酸-蒽酮试剂, 立刻塞上橡胶塞, 防止水分蒸发。将试管放入沸水中水浴保温 10 min, 取出后自然冷却至室温并摇匀。以加 2.5 mL 蒸馏水的试管为空白, 采用紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)测定 620 nm 处的吸光度值。

1.4 形态学鉴定

将高产 EPS 菌株在 PDA 培养基上进行三区划线, 37 °C 条件下培养至出现单菌落。参考《伯杰细菌鉴定手册》^[12]观察单菌落的菌落形状、大小、透明度、颜色以及菌落边缘形态。

挑取平板上的单菌落, 接种到 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至对数生长期, 分别进行革兰氏染色和芽孢染色, 用油镜观察菌体及芽孢的形态^[13]。

1.5 生理生化特性检验

采用 VITEK 全自动微生物鉴定分析系统(法国生物梅里埃股份有限公司)对高产 EPS 菌株的生理生化特性进行测定。经充填机将菌悬液注入试卡内, 封口后放入带有读数器的恒温培养箱, 根据试卡各生化反应孔中的变化情况, 由阅读器按光学扫描原理定时测定各生化介质中指示剂的显色(或浊度)反应, 把读出信息与预定阈值进行分析比较, 判定鉴定结果。

1.6 分子鉴定

采用细菌 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取高产 EPS 菌株的总 DNA, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行高产 EPS 菌株的 16S rRNA 基因测序和全基因组测序。将高产 EPS 菌株的 16S rRNA 基因测序结果导入美国国家生物技术信息中心(NCBI), 选用 rRNA/ITS databases 进行序列比对。在 LPSN 数据库下载比对结果中标准菌株的 16S rRNA 基因序列, 并导入 MEGA 11.0 中进行比对建树, 进行系统发育树分析。

使用程序 JspeciesWS 在线对高产 EPS 菌株全基因组进行平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)值的计算。选择在 16S rRNA 基因序列对比中相似性高且具有全基因组序列数据的菌株进行 ANI 分析。

1.7 高产 EPS 菌株发酵条件优化

1.7.1 生长曲线测定

将高产 EPS 菌株接种于 PDA 固体培养基, 37 °C 条件下培养 18 h 进行活化。用接菌环挑取活化的高产 EPS 菌株接种至装液量为 50.0 mL (250 mL 三角瓶) 的 PDA 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床振荡发酵培养, 每隔 2 h 取 1 次样, 测定发酵液在 600 nm 处的吸光度, 绘制菌株的生长曲线。

1.7.2 发酵条件优化

以 PDA 液体培养基为发酵培养基, 以发酵液中 EPS 含量为衡量指标, 设计正交试验, 对高产 EPS 菌株发酵条件(培养时间、培养温度和培养箱转速)进行优化(表 1)。

1.8 高产 EPS 菌株对土壤团聚体的影响

供试土壤为砂壤土, 过 0.25 mm 筛, 采用压力蒸汽灭菌器[致微(厦门)仪器有限公司] 121 °C 灭菌 20 min, 共 2 次。分别将高产 EPS 菌株发酵液(F1)、EPS 水溶液(EPS, 由 1.3 提取的 EPS 加入无菌水充分振荡溶解制成)、PDA 和对照(无菌水)按照 10.0% 的接种量接入装有 80.0 g 土样中培养皿中。将培养皿置于(28±2) °C

培养箱(上海博迅实业有限公司)中培养 40 d。培养过程中, 定期补充无菌水, 保持土壤表面相对湿润。

于试验结束时采用湿筛法测定 >0.25 mm 土壤水稳性团聚体含量^[9]。采用改良热水法提取多糖法提取土壤多糖^[14], 采用蒽酮-硫酸法测定土壤多糖含量^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

采用 LB-苯胺蓝平板培养结合菌丝拉丝法定性筛选获得 8 株具有产 EPS 性质的菌株, 分别为 G20、F1、G51、F36、G36、G55、F2、G46, 各菌株在 LB-苯胺蓝培养基上单菌落形态如图 1 所示。

将初筛获得的 8 株产 EPS 菌株分别经 LB、PDA、NA 和葡萄糖-酵母粉 4 种液体培养基发酵后, 测定发酵液中 EPS 含量, 结果如表 2 所示。8 株细菌在 4 种培养基中均产 EPS, 但不同菌株在相同培养基中的 EPS 产量不同, 同一菌株在不同培养基中的 EPS 产量也不同。菌株 F1 在 LB、PDA、NA 和葡萄糖-酵母粉培养基中 EPS 含量分别为 113.83、867.54、57.45 和 305.85 μg/mL, 均显著高于其他菌株($P < 0.05$), 并且 F1 在 PDA 培养基中 EPS 产量显著高于其他 3 种培养基, 表明 F1 具有高产 EPS 特性, PDA 是 F1 产 EPS 的最适合培养基。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学特征

由图 2 可知, F1 菌落呈规则的圆形, 表面凸起较湿润, 乳白色, 半透明。菌体较小, 呈杆状, 末端圆, 单个或呈短链排列, 革兰氏染色呈阳性。芽孢染色结果显示菌体呈红色, 产芽孢, 芽孢末端生, 呈绿色椭圆形。

表 1 高产 EPS 菌株发酵条件优化正交试验设计
Table 1 Orthogonal experimental design for optimization of fermentation conditions of high yield EPS strain

Number	Incubation time (h)	Incubation temperature (°C)	Incubator speed (r/min)
1	24	20	120
2	24	28	240
3	24	37	180
4	48	20	240
5	48	28	180
6	48	37	120
7	72	20	180
8	72	28	120
9	72	37	240

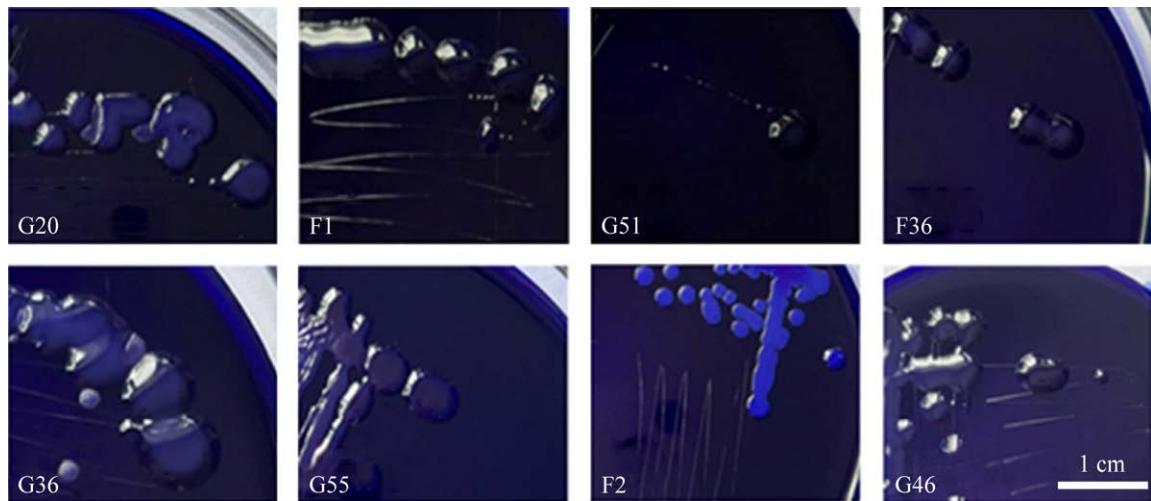


图 1 初筛产 EPS 菌株在 LB-苯胺蓝培养基上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of primary screening EPS producing strains on LB-aniline blue medium.

表 2 初筛菌株在不同培养基中 EPS 产量

Table 2 Exopolysaccharides yield in different media for initial screening strains ($\mu\text{g/mL}$)

Strain	LB	PDA	NA	Glucose-yeast powder
G20	50.22 \pm 4.25Ccd	562.72 \pm 2.57Ab	22.64 \pm 3.97Dde	121.49 \pm 11.93Bde
F1	113.82 \pm 4.38Ca	867.54 \pm 12.14Aa	57.45 \pm 5.53Da	305.85 \pm 16.52Ba
G51	33.99 \pm 2.55Cd	322.37 \pm 5.88Ae	17.54 \pm 3.91Ce	132.02 \pm 6.24Bcde
F36	58.77 \pm 7.04Cbc	512.28 \pm 16.44Ac	32.46 \pm 3.01Cbc	143.04 \pm 17.94Bcd
G36	73.99 \pm 6.12Cb	481.14 \pm 14.84Ad	24.95 \pm 4.35Dcde	218.14 \pm 13.34Bb
G55	33.99 \pm 0.51Cd	328.07 \pm 7.12Ae	32.02 \pm 4.57Cbc	98.25 \pm 5.17Be
F2	63.16 \pm 3.02Cbc	500.00 \pm 12.96Acd	35.53 \pm 3.30Db	163.53 \pm 29.98Bc
G46	40.35 \pm 1.02Bcd	135.53 \pm 10.13Af	31.14 \pm 2.36Bbcd	111.40 \pm 23.06Ade

Different small letters in the same vertical column indicate that there are significant differences in the EPS content among different strains in the same medium ($P < 0.05$). Different capital letters in the same row indicate that there are significant differences in the EPS content of the same strain in different medium ($P < 0.05$).

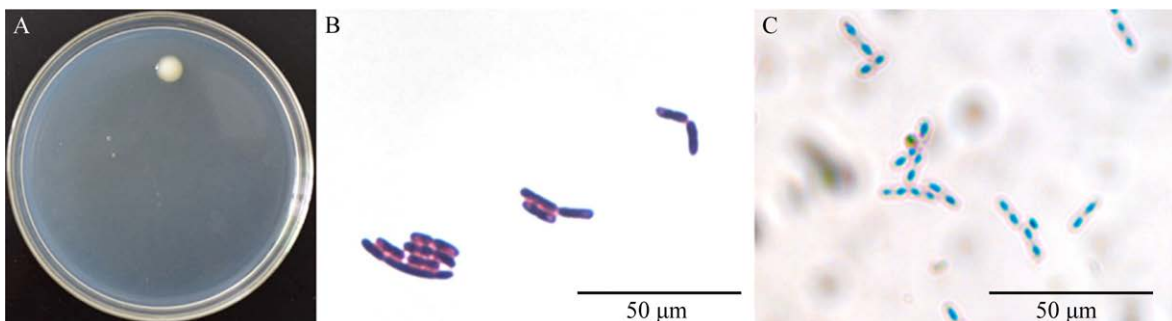


图 2 F1 菌落形态、革兰氏染色和芽孢染色结果

Figure 2 Colony morphology, Gram-staining, and spore staining result of F1. A: Colony morphology of F1. B: Gram-staining result of F1. C: Spore staining result of F1.

2.2.2 生理生化特性

参考芽孢杆菌 VITEK 鉴定方法鉴定菌株 F1 生理生化特性, 结果见表 3。菌株 F1 可利用 D-半乳糖、糖原、麦芽三糖、D-甘露糖、古老糖、D-海藻糖、D-葡萄糖、D-核糖作为碳源产酸发酵, 不能利用环糊精、肌醇、甲基-D-木糖甘、D-甘露醇、D-松三糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖、L-鼠李糖、D-塔格糖和菊粉。菌株 F1 初步鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 鉴定率为 94.00%。

2.2.3 分子生物学鉴定

将菌株 F1 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行比对, 运用 MEGA 11.0 软件构建

系统发育树。结果如图 3 所示, 菌株 F1 为芽孢杆菌属, 与花椒芽孢杆菌(*Bacillus zanthoxyli*^T, 登录号 KX865140)、阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*, 登录号 B8W22^T)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*, 登录号 IAM 13418^T)亲缘关系较近, 但是无法借助 16S rRNA 基因序列进行准确鉴定。因此, 将 F1 全基因组序列与 16S rRNA 基因序列对比中相似性较高且具有全基因组序列数据的菌株进行 ANI 分析, 结果表明 F1 与 *Bacillus megaterium* 的 ANI 值最高为 99.54% (表 4)。因此, 结合菌落形态及生理生化特征, 将菌株 F1 鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

表 3 菌株 F1 生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain F1

Test items	Results	Test items	Results
β-xylosidase	–	Cyclodextrin	–
L-lysine arylaminase	–	D-galactose	+
L-aspartate arylaminase	+	Glycogen	+
Leucine arylaminase	+	Inositol	–
Phenylalanine arylaminase	+	Methyl-α-D-glucopyranosidation	–
L-proline arylaminase	–	Ellman	–
β-galactosidase	+	Methyl-D-xyloside	–
L-pyrrolidone arylaminase	+	Maltotriose	+
α-galactosidase	+	D-mannitol	–
Alanine arylaminase	+	D-mannose	+
Tyrosine arylaminase	+	D-pinotriose	–
β-N-acetylglucosaminidase	+	N-acetyl-D-glucosamine	–
Alanine-phenylalanine-proline arylaminase	–	Ancient sugar	+
α-mannosidase	–	L-rhamnose	–
β-glucosidase	+	Phosphorylcholine	–
β-mannosidase	–	Pyruvate	+
Triphenyl tetrazolium chloride	–	D-tagatose	–
α-glucosidase	+	D-trehalose	+
Resistant to kanamycin	–	Inulin	–
Resistant to bambusamycin	–	D-glucose	+
Resistant to polymyxin B	–	D-ribose	+
Esculin hydrolysis	+	Putrescine assimilation	–
6.5% sodium chloride growth	+		

+: Positive; –: Negative.

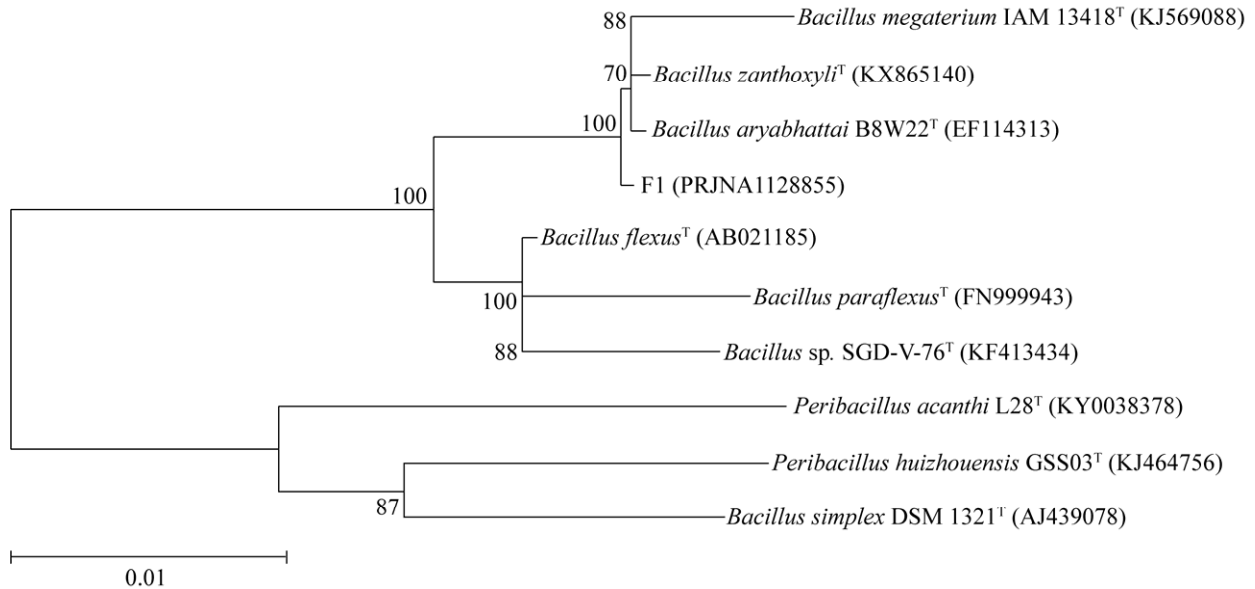


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建 F1 菌株及亲缘关系相邻菌株的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain F1 and its closely related neighbours. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method and the bootstrap value was set to 1 000.

表 4 F1 与其相似度较高的菌株间的 ANI 值

Table 4 ANI values between F1 and strains with high similarity (%)

	F1	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
F1	100.00			
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	95.69	100.00		
<i>Bacillus aryabhatai</i>	95.69	98.64	100.00	
<i>Bacillus megaterium</i>	99.54	95.67	95.68	100.00

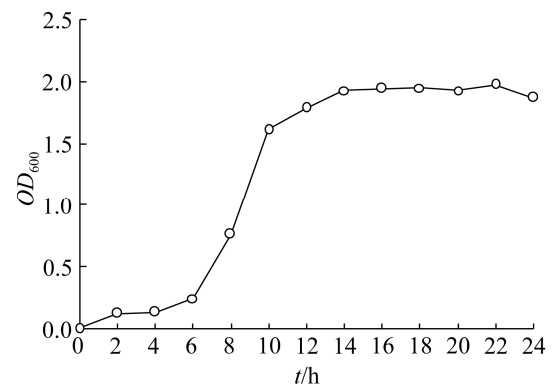


图 4 F1 生长曲线

Figure 4 The growth curve of strain F1.

2.3 F1 产 EPS 发酵条件优化

2.3.1 生长曲线

F1 在 PDA 液体培养基中的生长曲线如图 4 所示, 0-4 h 为延迟期, 从第 6 h 开始菌体进入对数生长期, 发酵液 OD_{600} 值快速升高, 从第 14 h 开始进入生长平台期。因此, 选择培养 12-14 h 的菌体作为种子液。

2.3.2 发酵条件优化

以培养时间、培养温度和培养箱转速为因素, 以 F1 发酵液 EPS 含量为指标, 设计三因素三水平正交试验, 结果见表 5。根据极差 R 的大小确定三因素对发酵液 EPS 含量影响的权重关系为培养时间>培养箱转速>培养温度。根据

K 值大小, 获得 F1 产 EPS 最佳发酵条件为 28 °C、180 r/min 发酵 24 h, 在此条件下, F1 发酵液 EPS 含量为 1 123.39 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 F1 对土壤团聚体的影响

如表 6 所示, 经过 40 d 培养后, F1 发酵液和 EPS 水溶液处理组土壤 >0.25 mm 水稳性大团

聚体含量和多糖含量分别为 9.74% 和 18.54 $\mu\text{g/g}$ 、5.20% 和 10.99 $\mu\text{g/g}$, 均显著高于 PDA 处理组和无菌水对照处理组 ($P < 0.05$)。粒径 >0.25 mm 土壤水稳性大团聚体含量与土壤多糖含量的皮尔逊相关性系数为 0.825, 呈极强的正相关关系。结果说明, 土壤中添加 F1 发酵液或其 EPS 水溶液均可通过提高土壤多糖含量进而促进 >0.25 mm 土壤水稳性大团聚体的形成。

表 5 正交试验结果分析表

Table 5 Analysis table of orthogonal test results

Number	Incubation time (h)	Incubation temperature (°C)	Rotate speed (r/min)	EPS content ($\mu\text{g/mL}$)
1	24	20	120	657.83±31.26
2	24	28	240	1 097.67±36.51
3	24	37	180	1 088.60±34.15
4	48	20	240	917.08±42.14
5	48	28	180	889.91±63.16
6	48	37	120	647.98±9.73
7	72	20	180	473.80±9.26
8	72	28	120	364.52±11.74
9	72	37	240	387.34±23.70
K_1	948.033	682.903	556.777	
K_2	818.323	784.033	800.697	
K_3	408.553	707.973	817.437	
Range (R)	539.48	101.13	260.66	
Factor optimum level	24	28	180	

表 6 F1 发酵液对土壤水稳性大团聚体含量和土壤多糖含量的影响

Table 6 Effect of F1 fermentation broth on contents of hydrostable aggregate and soil polysaccharide

Treatment	Content of >0.25 mm water stable aggregate (%)	Content of soil polysaccharide ($\mu\text{g/g}$)
CK	1.79±0.43d	1.62±0.45d
PDA	3.24±0.34c	5.93±0.33c
EPS	5.20±0.24b	10.99±0.71b
F1	9.74±0.62a	18.54±5.04a
Pearson correlation coefficient	0.825**	

Different small letters in the same column indicate that there are significant differences for the same index among different treatments; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

土壤团聚体是构成土壤结构的基本单元, 是由土壤中的原生颗粒经过胶结物的胶结、凝结、黏结等作用形成, 主要通过改变土壤的物理性质、土壤肥力、土壤微生物活性与丰度等, 影响土壤质量^[6-7,15-18]。微生物 EPS 由于其本身结构的特殊性(线性大分子结构)和分子内活性基团的多样性(富含羟基、羧基等官能团及大量的酸性基团), 能够胶结土壤颗粒, 促进大粒径土壤团聚体的形成, 并且能够在颗粒表面形成衣膜, 起到稳定团聚体的作用^[3,5,19-20]。可见, EPS 是促进团聚体形成与稳定的重要助力, 高产 EPS 的菌株在土壤结构改良方面具有较好的应用前景。然而, 目前应用于土壤结构改良的菌种资源十分有限, 迫切需要筛选 EPS 产量高, 兼具促生抗逆特性, 而且环境友好的功能菌株, 为复合功能菌剂的研发和产业化应用提供候选菌种资源。

菌种的筛选鉴定及发酵条件优化是功能微生物菌剂研发和生产应用的重要环节。细菌菌株类型、生长阶段、底物可利用性及发酵条件等均会影响细菌 EPS 的产生及其组成^[5,21-24]。不同的细菌细胞对培养基碳源和氮源有不同的喜好, 培养基碳氮来源及其浓度影响 EPS 的产生效率, 速效碳源(例如葡萄糖)能有效促进细菌代谢产生 EPS, 而过量的无机氮阻碍 EPS 的产

生^[2,23,25], 因此, 合适的培养基碳氮比可确保 EPS 的最大产量。发酵条件(如温度、培养时间、接种量、pH 等)的确定是菌液发酵的重要环节, 直接影响发酵液的质量。研究表明, 大多数细菌产生 EPS 的最佳生长温度为 25–30 °C^[23], 最佳 pH 条件为中性^[2,24], 这主要取决于菌株本身的性质。本研究从滨海盐碱土筛选获得一株具有高产 EPS 特性的 PGPR 功能菌株 F1, 28 °C、180 r/min 条件下经 PDA 发酵培养 24 h, EPS 产量为 1 123.39 µg/mL, 显著高于其他条件, 这可能是该培养条件下最有利于 F1 利用碳源, 促进生长代谢诱导 EPS 的产生。为深入研究 F1 菌株的功能特性, 促进其菌剂研发与应用, 我们将继续深入研究 F1 不同生长阶段, 培养基碳氮来源、碳氮比及发酵条件(如 pH、接种量等)对 EPS 生成的影响。

近年来, 随着连续耕作及化肥的过度使用, 土壤结构受到极大的破坏, 导致土壤持水保肥能力急剧下降, 微生物群落稳定性降低, 严重影响了农业生产效率。EPS 在驱动土壤颗粒团聚和促进团聚体稳定方面的研究受到广泛关注, 细菌 EPS 作为土壤颗粒的有效胶结剂, 在改善土壤结构、提升土壤质量方面成效显著^[5,20]。研究表明, 向土壤中施加产 EPS 的细菌发酵液或其 EPS 水溶液均能提高土壤多糖含量, 促进土壤水稳性团聚体的形成和稳定性提高, 起到改善土壤结构的作用^[21,26-27]。本研究将高产 EPS 菌株 F1 的发酵液和 EPS 水溶液应用于砂壤土 40 d 后, F1 发酵液和 EPS 水溶液处理组 >0.25 mm 土壤水稳性大团聚体含量分别比对照提高了 4.44 倍和 1.91 倍, 而且 >0.25 mm 土壤水稳性大团聚体含量与土壤多糖含量呈极强的正相关性。结果表明, F1 可通过提高土壤多糖含量进而促进 >0.25 mm 土壤水稳性大团聚体的形成。EPS 的单糖片段网状分子结构使其具有强大的

黏附性, 能黏合在土壤颗粒表面形成一个被大量土壤颗粒包围的中间区域^[3,19], 土壤颗粒与 EPS 在该区域不断黏合逐渐形成 >0.25 mm 的大团聚体, 最终使分散的砂壤土颗粒聚集在一起, 提高砂质土壤的土壤团聚体比例及其稳定性, 提高砂质土壤的水肥持有能力。本研究的不足之处是未设置原始土壤处理组, 产 EPS 菌株是否通过影响土壤原有微生物群落结构而影响土壤多糖含量, 最终对土壤的水稳性团聚体含量产生影响将是我们下一步工作重点之一。

综上所述, 本研究从滨海盐碱土分离筛选获得一株具有高产 EPS 特性的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) F1, 可通过提高土壤多糖含量促进砂壤土水稳性大团聚体的形成并维持其稳定性, 具有进一步开发推广价值。

参考文献

- [1] DAR A, AHMAD ZAHIR Z, IQBAL M, MEHMOOD A, JAVED A, HUSSAIN A, Bushra, AHMAD M. Efficacy of rhizobacterial exopolysaccharides in improving plant growth, physiology, and soil properties[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2021, 193(8): 515.
- [2] SAHA I, DATTA S, BISWAS D. Exploring the role of bacterial extracellular polymeric substances for sustainable development in agriculture[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(11): 3224-3239.
- [3] CHENG C, SHANG-GUAN WL, HE LY, SHENG XF. Effect of exopolysaccharide-producing bacteria on water-stable macro-aggregate formation in soil[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(8): 738-745.
- [4] COSTA OYA, RAAIJMAKERS JM, KURAMAE EE. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1636.
- [5] 张铭, 蔡鹏, 吴一超, 高春辉, 刘俊, 黄巧云. 细菌胞外聚合物: 基于土壤生态功能的视角[J]. *土壤学报*, 2022, 59(2): 308-323.
ZHANG M, CAI P, WU YC, GAO CH, LIU J, HUANG QY. Bacterial extracellular polymeric substances: from the perspective of soil ecological

- functions[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(2): 308-323 (in Chinese).
- [6] WILPISZESKI RL, AUFRECHT JA, RETTERER ST, SULLIVAN MB, GRAHAM DE, PIERCE EM, ZABLOCKI OD, PALUMBO AV, ELIAS DA. Soil aggregate microbial communities: towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(14): e00324-19.
- [7] DING CX, XU XJ, LIU YW, HUANG X, XI MY, LIU HY, DEYETT E, DUMONT MG, DI HJ, HERNÁNDEZ M, XU JM, LI Y. Diversity and assembly of active bacteria and their potential function along soil aggregates in a paddy field[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 866: 161360.
- [8] 李娜, 韩晓增, 尤孟阳, 许玉芝. 土壤团聚体与微生物相互作用研究[J]. *生态环境学报*, 2013, 22(9): 1625-1632.
- LI N, HAN XZ, YOU MY, XU YZ. Research review on soil aggregates and microbes[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(9): 1625-1632 (in Chinese).
- [9] 杜秀娟. 产胞外多糖细菌筛选及其对土壤团聚体的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2016.
- DU XJ. Screening of extracellular polysaccharide-producing bacteria and its effect on soil aggregates[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [10] 李嘉文, 刘达, 刘党生, 王昆, 谢明蓉. 乳酸菌胞外多糖产生菌的筛选与初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(9): 1027-1033.
- LI JW, LIU D, LIU DS, WANG K, XIE MR. Screening of and preliminary research on exopolysaccharides producing strain[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2019, 31(9): 1027-1033 (in Chinese).
- [11] DuBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [12] RE 布坎南, NE 吉本斯. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Translation group of "Bergey's manual of determinative bacteriology" Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th edition. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [14] WANG S, REDMILE-GORDON M, MORTIMER M, CAI P, WU YC, PEACOCK CL, GAO CH, HUANG QY. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from red soils (Ultisols)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135: 283-285.
- [15] 刘亚龙, 王萍, 汪景宽. 土壤团聚体的形成和稳定机制: 研究进展与展望[J]. *土壤学报*, 2023, 60(3): 627-643.
- LIU YL, WANG P, WANG JK. Formation and stability mechanism of soil aggregates: progress and prospect[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2023, 60(3): 627-643 (in Chinese).
- [16] 陈昊, 马帅, 王小治. 土壤团聚体形成和稳定机理研究进展[J]. *现代农业科技*, 2023(2): 150-155.
- CHEN H, MA S, WANG XZ. Research progress on formation and stability mechanism of soil aggregates[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023(2): 150-155 (in Chinese).
- [17] 尹国强, 胡颂江, 蓝诗霞, 罗红琴, 欧阳帅. 森林土壤团聚体影响因素及生态功能研究进展[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2023, 45(6): 1340-1348.
- YIN GQ, HU SJ, LAN SX, LUO HQ, OUYANG S. Research progress on influencing factors and ecological functions of forest soil aggregates[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2023, 45(6): 1340-1348 (in Chinese).
- [18] TOTSCHKE K, AMELUNG W, GERZABEK M, GUGGENBERGER G, KLUMPP E, KNIEF C, LEHNDORFF E, MIKUTTA R, PETH S, PRECHTEL A, RAY N, Kögel-KNABNER I. Microaggregates in soils[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2018, 181: 104-136.
- [19] 谭文峰, 许运, 史志华, 蔡鹏, 黄巧云. 胶结物质驱动下的土壤团聚体形成过程与稳定机制[J]. *土壤*, 2023, 60(5): 1297-1308.
- TAN WF, XU Y, SHI ZH, CAI P, HUANG QY. The formation process and stabilization mechanism of soil aggregates driven by binding materials[J]. *Soils*, 2023, 60(5): 1297-1308 (in Chinese).
- [20] 魏宏宇, 李怡, 彭帅英, 黄林, 张宝, 李昆太, 程新. 胞外多糖促进胁迫条件下农作物生长的研究与展望[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(4): 1123-1134.
- WEI HY, LI Y, PENG SY, HUANG L, ZHANG B, LI KT, CHENG X. Promoting crop growth under stress

- conditions by exopolysaccharides: review and perspective[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 38(4): 1123-1134 (in Chinese).
- [21] 李慧芬, 方安然, 冯海霞, 黄剑, 赵明珠, 周波. 胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其促生改土作用[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 1941-1957.
LI HF, FANG AR, FENG HX, HUANG J, ZHAO MZ, ZHOU B. Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing strain and the influence on soil quality and crop growth[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 1941-1957 (in Chinese).
- [22] BYSTRIANSKÝ L, HUJSLOVÁ M, GRYNLER M. Study of the effects of mineral salts on the biofilm formation on polypropylene fibers using three quantification methods[J]. *Folia Microbiologica*, 2021, 66(1): 133-143.
- [23] SENGUPTA D, DATTA S, BISWAS D. Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4): 1587-1598.
- [24] BLANCO Y, RIVAS LA, GONZÁLEZ-TORIL E, RUIZ-BERMEJO M, MORENO-PAZ M, PARRO V, PALACÍN A, AGUILERA Á, PUENTE-SÁNCHEZ F. Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 384-393.
- [25] REDMILE-GORDON MA, EVERSLED RP, HIRSCH PR, WHITE RP, GOULDING KWT. Soil organic matter and the extracellular microbial matrix show contrasting responses to C and N availability[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 257-267.
- [26] 张文平, 李昆太, 黄林, 魏赛金, 程新. 产胞外多糖菌株的筛选及其对土壤团聚体的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(4): 772-779.
ZHANG WP, LI KT, HUANG L, WEI SJ, CHENG X. Screening of exopolysaccharide-producing bacteria and their effects on aggregation in soil[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39(4): 772-779 (in Chinese).
- [27] 茹素龙, 赵永龙, 王紫薇, 曹晶晶, 汪志琴, 赵盼, 仲乃琴. 产胞外多糖菌株的分离鉴定及其功能研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(11): 4315-4329.
RU SL, ZHAO YL, WANG ZW, CAO JJ, WANG ZQ, ZHAO P, ZHONG NQ. Isolation, identification, and functional characterization of exopolysaccharide-producing strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4315-4329 (in Chinese).