

李骐言,李琼芳,王建萍,等. 2 株分离自黄龙冷水型水体中土著细菌的胞外有机酸代谢组分分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):274-277.

2 株分离自黄龙冷水型水体中 土著细菌的胞外有机酸代谢组分分析

李骐言, 李琼芳, 王建萍, 马政庆, 包莉萍, 乔 锐, 邓 雄

(西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000)

摘要:对 2 株分离自黄龙冷水型水体的土著细菌 020-18、021-3 生长各阶段的胞外有机酸代谢组分进行了表征分析。结果表明:在迟缓期、对数期、稳定期及衰亡期等各个生长阶段,2 菌株向胞外分泌 7 种有机酸的成分及含量各异;在对数期、稳定期生长阶段,2 菌株在胞外积累了苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸等有机酸。

关键词:高效液相色谱;细菌;有机酸;黄龙风景区

中图分类号: Q657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0274-04

黄龙风景区位于四川省阿坝藏族羌族自治州松潘县内,海拔 3 145~3 578 m,沟内钙华沉积长 3.6 km,宽 110~250 m,厚 9~20 m,其独特的钙华沉积景观色彩绚丽,于 1992 年被联合国教科文组织列为世界自然遗产,是我国最为珍贵的自然景观之一。钙华景观的形成主要是 $\text{CaCO}_3\text{—H}_2\text{O—CO}_2$ 三相互作用的结果^[1]。目前国内众多学者对于钙、水的来源已经基本达成了共识^[2],但对于 CO_2 的来源主要存在 2 种观点,即冷成因论^[3](或气候成因论)与热成因论^[4](深成因论)。冷成因论认为, CO_2 主要来源于土壤及大气,认为生物成因、

大气成因占主导作用;热成因论认为, CO_2 主要来自地球内部。钙化景区冷水型水体中土著微生物通过自身呼吸作用产生并释放的 CO_2 作为灰岩的侵蚀溶解动力是很有可能的,但更为重要的是微生物能通过自身代谢产物(如有机酸、氨基酸、多糖、蛋白质等)对碳酸盐岩的沉积产生巨大影响。有学者认为,微生物碳酸盐岩沉积作用的发生主要是建立在胞外聚合物(EPS)、微生物膜(biofilm)、微生物席(microbial mat)等生物基础之上的^[5-6]。微生物通过向胞外分泌 EPS,不断捕捉及黏附钙离子,将微小晶粒附着于微生物膜(亚毫米级)上。微生物膜在捕捉、黏附的同时也可通过自身不断生长成更厚的微生物席(毫米级),进而对较大的沉积颗粒进行捕捉、黏附,最终形成微生物碳酸盐岩。近年来,国内外众多学者对微生物介导的碳酸盐岩沉积物进行了大量研究,肯定了碳酸盐岩沉积形成过程中微生物所起的重要作用。邢智峰等发现,在西云梦山组地层的纵剖面上,毫米级的深色沉积物层、浅色石英颗粒层交替出现,形成了典型的微生物席纹层,

收稿日期:2013-08-27

基金项目:国家自然科学基金主任基金(编号:41040004)。

作者简介:李骐言(1988—),女,福建龙岩人,硕士研究生,从事微生物研究。E-mail:leeqiyan@163.com。

通信作者:李琼芳,博士,副教授,主要从事微生物研究。E-mail:liqiongfang1992@126.com。

参考文献:

- [1] Leicht W, Fuchs R, Londershausen M. Stability and biological activity of cyfluthrin isomers[J]. Pesticide Science, 1996, 48(4):325-332.
- [2] Lodhi A, Naqvi S M, Fuhr F, et al. Degradation of ^{14}C -labelled cyfluthrin in soil and incorporation of ^{14}C humus fractions as affected by wheat straw amendment and moisture conditions[J]. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 1996, 39(5/6/7/8):128-131.
- [3] Smith S, Willis G H, Cooper C M. Cyfluthrin persistence in soil as affected by moisture, organic matter, and redox potential[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1995, 55(1):142-148.
- [4] Dondi M, Flieger M, Olsovska J, et al. High-performance liquid chromatography study of the enantiomer separation of chrysanthemic acid and its analogous compounds on tergruride-based stationary phase[J]. J Chromatogr A, 1999, 859(2):133-142.
- [5] 李朝阳, 张智超, 张 玲, 等. 土壤中高效氟氯菊酯对映体选择性降解的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6):1640-1643.
- [6] Liu W, Qin S, Gan J. Chiral stability of synthetic pyrethroid insecticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10):3814-3820.
- [7] Qin S, Gan J. Abiotic enantiomerization of permethrin and cypermethrin; effects of organic solvents[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(14):5734-5739.
- [8] Lee W, Kim B H. Liquid chromatographic resolution of pyrethroic acid and their esters on chiral stationary phases[J]. J High Resol Chromatogr, 1998, 21(3):189-192.
- [9] Ruzo L O, Holmstead R L, Casida J E. Pyrethroid photochemistry: decamethrin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, 25(6):1385-1394.
- [10] Holmstead R L, Casida J E, Ruzo L O, et al. Pyrethroid photodecomposition: permethrin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3):590-595.
- [11] 程学礼. 三元杂环化合物的量子化学研究[J]. 泰山学院学报, 2003, 25(6):76-79.

表明微生物在沉积表面发生多次生长、埋藏^[7]。唐鑫萍等认为,山东省平邑盆地古近系湖相的 3 种微生物碳酸盐岩(核形石、叠层石、凝块石)是以微生物成因(EPS、微生物膜、微生物席)、微生物作用为共同基础在不同的环境条件下形成的^[8]。Kenward 等证实了白云石沉淀发生在异化型铁还原菌停止活动而产甲烷古菌新陈代谢活动繁盛后,证明产甲烷菌能够促进白云石在低温下沉淀^[9]。Tong 等研究发现,左旋天冬氨酸单体的添加对碳酸球文石晶型的形成具有特殊的调节作用^[10]。周雪莹等发现,胶质芽孢杆菌在不同的培养条件下由于数量、荚膜多糖、碳酸酐酶活性的差异使得碳酸钙晶体的数量、形貌差异较大^[11]。由此可见,微生物及其丰富的胞外代谢产物对碳酸钙晶体中晶型及形貌的影响不可忽视。本研究以探究黄龙风景区土著微生物胞外有机酸在钙华景观形成中的参与程度为出发点,对黄龙风景区特殊冷水型水体中土著细菌在各个生长阶段所分泌的胞外有机酸组分进行了分析,旨在为揭示黄龙风景区钙华景观形成的生物成因提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 从黄龙冷水型水体中分离筛选出 2 株具有较大荚膜的细菌菌株(编号:020-18、021-3)。

1.1.2 有机酸标准溶液 精确称取草酸 0.05 g、乳酸、冰乙酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸各 0.5 g。用超纯水溶解并定容至 100 mL 容量瓶,得到混合标准酸储备液,密封并于 4 ℃ 冰箱中保存待用。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线的绘制 挑取 2 环菌体于盛有 100 mL 牛肉膏蛋白胨培养基的三角瓶中(250 mL),于 150 r/min、30 ℃ 恒温培养箱中振荡培养 36 h 进行活化。按 2.5% (V/V) 接种量分别将菌体接种于盛有牛肉膏蛋白胨培养基的三角瓶中,以无菌培养基作为空白对照,每 6 h 取样测定菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值,重复 3 次,绘制菌株的生长曲线。

1.2.2 培养液的预处理 按 2.5% (V/V) 接种量分别将菌体接种于盛有牛肉膏蛋白胨培养基的三角瓶中,振荡培养条件同上。定时对不同生长时段(迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期)的培养液进行取样,并于 10 000 r/min、4 ℃ 下低温冷冻离心 10 min,收集上清液,用 0.45 μm 微孔过滤待用。

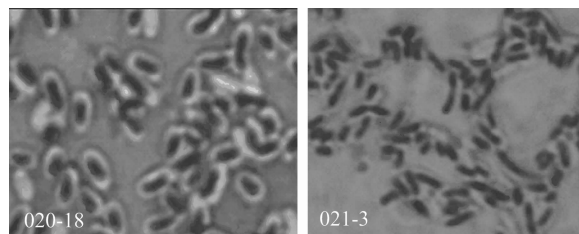
1.2.3 标准曲线的绘制 取混合酸储备液依次稀释 2、10、20、100 倍,得到乙酸浓度分别为 5 000、2 500、500、250、50 mg/L 的标准混酸溶液,密封并于 4 ℃ 冰箱保存待用。

1.2.4 色谱条件 美国 Agilent 1260 高效液相色谱仪,ZORBA SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 30 ℃,检测波长为 205 nm;流动相为 pH 值为 2.45 的 3% CH₃OH-0.05 mol/L Na₂HPO₄ (V/V) 缓冲溶液,流速为 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 菌株荚膜染色

菌株 020-18、021-3 荚膜染色后于油镜下观测结果见图 1,可见 2 菌株菌体细胞周围包裹了 1 层荚膜。



菌株020-18

菌株021-3

图1 菌株 020-18、021-3荚膜染色结果

2.2 生长曲线

由图 2、图 3 可见,菌株 020-18 迟缓期并不明显,6 h 便已经进入对数期,20 h 进入稳定期。菌株 021-3 具有明显的迟缓期(0~10 h),12 h 进入对数期,20 h 左右进入稳定期。由于本试验以吸光度为表征依据,衰亡期虽多数菌体已死亡,但悬浊度仍然维持一定水平,故吸光度变化不大。最终确定菌株 020-18 生长各时段培养时限分别为:迟缓期 6 h、对数期 18 h、稳定期 30 h、衰亡期 72 h;菌株 21-3 生长各时段培养时限分别为:迟缓期 12 h 对数期 18 h、稳定期 24 h、衰亡期 54 h。

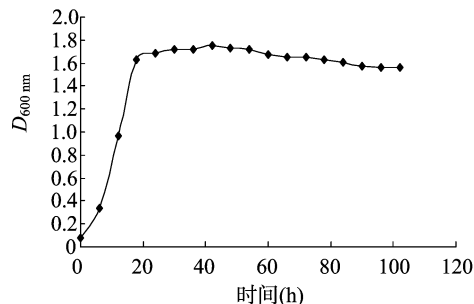


图2 菌株020-18的生长曲线

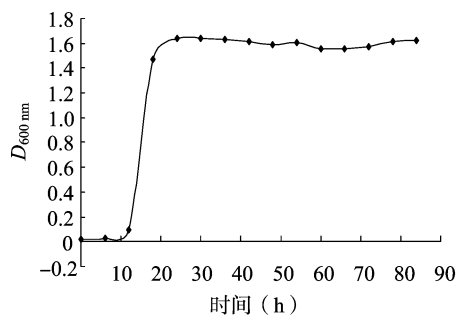


图3 菌株021-3的生长曲线

2.3 液相色谱条件的确定

2.3.1 测定波长及缓冲溶液的选取 将标准混酸溶液进样后进行全波长扫描,发现 205、210、215 nm 处波长对 7 种有机酸吸收均较好,选取分离效果最好的 205 nm 作为检测波长。高效液相色谱测定有机酸试验多用磷酸盐或甲醇/乙腈-磷酸盐缓冲液体系进行洗脱分离。磷酸盐体系下各有机酸分离洗脱时间较长,但添加甲醇、乙腈后,不仅可以缩短各酸保留时间,还可以调整改善各有机酸峰型,减少拖尾。预试验发现:3% CH₃OH-0.05 mol/L Na₂HPO₄ (V/V) 缓冲体系在 pH 值为 2.45 条件下能较好地对各有机酸进行分离。

2.3.2 柱温、流速 有机酸在缓冲液中的解离程度随着温度的升高而增加,不利于有机酸的分离,较高的温度也会使有机酸分离效果变差^[12],因此本试验选择 30 ℃ 作为分离柱温,最

终选择流速为 1 mL/min。

2.4 有机酸标准图谱

在已确定的色谱条件下对 7 种混酸溶液进行分离,色谱分离图谱见图 4。

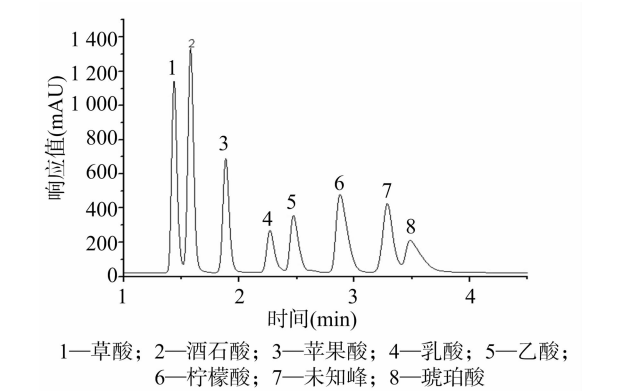


图4 有机酸标准色谱图

有机酸标准色谱图上共出现 8 峰,可知从混合酸标准溶液中共分离了 8 种物质,除已知的 7 种有机酸外,必然存在 1 峰为杂质峰。分别配置浓度均为 5 mg/L 的 7 种有机酸的单一标准溶液,依次进样分析,发现第 7 峰为杂质峰。

2.5 有机酸标准曲线绘制

将稀释倍数分别为 100、20、10、2 倍的标准混酸溶液依次进样,计算不同浓度下各有机酸的峰面积,并进行线性回归。由表 1 可知,各有机酸含量线性方程回归良好。

表 1 各有机酸线性相关分析

有机酸	浓度范围 (mg/L)	线性回归方程	决定系数
草酸	5 ~ 500	$y = 7.575\ 1x + 11.769$	$r^2 = 0.999\ 8$
酒石酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.918\ 4x + 41.003$	$r^2 = 0.999\ 8$
苹果酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.516\ 9x + 23.985$	$r^2 = 0.999\ 9$
乳酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.394\ 2x - 0.485\ 5$	$r^2 = 1.000\ 0$
乙酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.334\ 7x + 0.220\ 3$	$r^2 = 1.000\ 0$
柠檬酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.613\ 4x + 1.080\ 0$	$r^2 = 1.000\ 0$
琥珀酸	50 ~ 5\ 000	$y = 0.351\ 1x - 0.243\ 5$	$r^2 = 1.000\ 0$

2.6 菌株各时期的有机酸的测定

在已确定的色谱条件下对菌株 020 - 18、021 - 3 各生长期胞外发酵液中 7 种有机酸进行色谱分离,其中 020 - 18、

021 - 3 对数期分离结果见图 5、图 6。

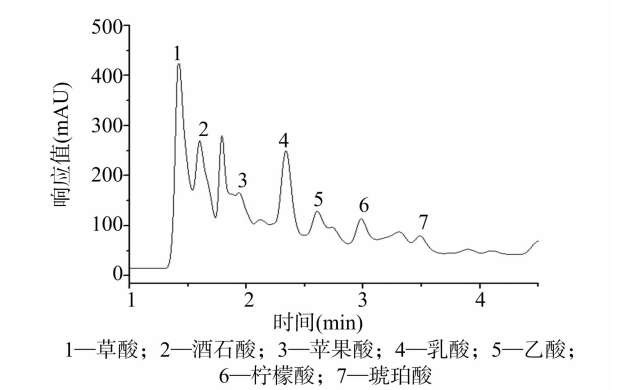


图5 菌株020-18对数生长期胞外分泌有机酸的色谱分离结果

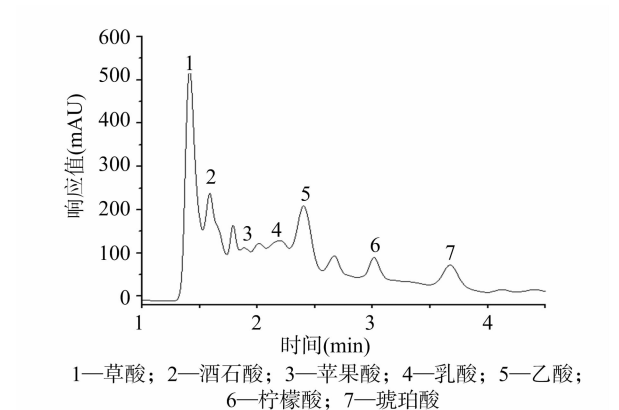


图6 菌株021-3对数生长期胞外分泌有机酸的色谱分离结果

牛肉膏蛋白胨培养基本身含有一定量的上述各有机酸,故考察菌株各生长期胞外有机酸代谢量时,需扣除培养基中各有机酸本底值,当有机酸代谢量为负数时,表明菌株在生长代谢过程中消耗了有机酸。

由表 2 可知,菌株 020 - 18 在生长初期开始消耗草酸、乙酸,且需求量随着培养时间的延长不断增大;酒石酸、苹果酸在菌体生长初期有一定积累,随着培养时间的延长不断被消耗;随着培养时间的延长,乳酸含量呈现先增加后下降趋势,在对数期达到最大值 59.951 mg/L;随着培养时间的延长,柠檬酸含量呈现增加一下降一增加趋势,在衰亡期达到最大值 2 111.145 mg/L。

表 2 菌株 020 - 18 各生长期胞外有机酸代谢量

时间 (h)	有机酸代谢量(mg/L)						
	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸
6	-62.768	970.799	33.127	-10.518	-237.976	84.229	1 352.053
18	-87.479	-336.927	-24.325	59.951	-512.696	174.357	517.242
30	-140.402	-575.256	-138.758	24.616	-865.942	-316.627	595.505
72	-259.392	-1 223.930	-228.774	-19.001	-859.892	2 111.145	606.666

由表 3 可知,随着培养时间的延长,培养液中草酸含量呈现下降趋势,24 h 出现最低值 14.222 mg/L,衰亡期含量增加;菌体生长初期,酒石酸含量达到最大值 408.375 mg/L,随着培养时间的延长,含量呈先降低后升高趋势;菌体对数生长期对苹果酸的消耗较大,随着培养时间的延长,稳定期苹果酸含量达到最大值,随后含量下降;随着培养时间的增加,乳酸

含量逐渐增大,54 h 达到最大值 2 412.68 mg/L;菌体生长初期乙酸含量达到最大值 1 695.052 mg/L,进入对数期后含量陡然下降,随着培养时间的延长,衰亡期为 -2 678.12 mg/L。菌体整个生长过程中柠檬酸、琥珀酸含量皆呈现先增加后下降趋势,对数时期柠檬酸含量达最大值 192.174 mg/L,琥珀酸在对数期、稳定期含量相对稳定。

表 3 菌株 021-3 各生长期胞外有机酸代谢量

时间 (h)	有机酸代谢量(mg/L)						
	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸
12	43.100	408.375	213.366	-31.667	1 695.052	148.552	112.088
18	27.067	-43.058	-459.985	971.405	45.295	192.174	1 416.245
24	14.222	-359.066	1 318.039	2 368.248	-2 719.330	105.776	1 306.009
54	40.066	-359.446	-161.316	2 412.680	-2 678.120	-105.819	72.461

3 结论与讨论

三羧酸循环(TCA)普遍存在于动物、植物、微生物细胞中,不仅是机体在有氧条件下获得能量的主要代谢途径,其中间代谢产物更是合成某些重要有机物的必要前体物质,如 α -酮戊二酸、草酰胺酸分别为谷氨酸、天冬氨酸的前体。微生物生长代谢过程中,利用培养基中的营养物质,在菌体细胞内通过 TCA 等途径不断合成多种有机酸,当积累到一定浓度时,胞内外电化学梯度、渗透压发生改变,有机酸通过跨膜运输等方式运输至胞外,并滞留于培养液中。最初培养基中碳源被分解利用形成丙酮酸,通过氧化脱羧方式生成乙酰 CoA,并在线粒体中与起始底物草酰乙酸依次合成柠檬酸、琥珀酸、苹果酸等有机酸。在菌体生长初期,菌株 020-18 不同程度地合成并分泌酒石酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸等有机酸,随着培养时间的增加,苹果酸、琥珀酸、柠檬酸等 TCA 循环中间产物连同其他代谢有机酸(草酸、乙酸、酒石酸)被不同程度消耗。这可能是由于菌株 020-18 菌体细胞较大、荚膜较厚,除了大量利用培养基中的营养物质外,通过各代谢途径合成的有机酸随着营养物质的消耗殆尽也被不同程度重新摄入细胞加以利用,以满足机体生长所需。随着培养时间的延长,柠檬酸含量陡然增高,这可能与菌株利用碳源的偏好性及后期细胞内外环境剧烈改变有关,菌株 020-18 可能更偏向利用琥珀酸、乙酸、酒石酸等有机酸,导致重新摄入的以及通过 TCA 途径不断合成的柠檬酸暂时积累于菌体细胞内。随着衰亡期的到来,菌体逐渐趋向凋亡,细胞内外 pH 值、电化学梯度以及渗透压等环境因素发生剧烈变化,使得柠檬酸最终被大量释放到胞外培养液中。菌株 021-3 在整个生长过程中均不同程度地代谢 7 种有机酸,由于生长初期菌体繁殖量小,少量的柠檬酸、琥珀酸在菌体内合成并分泌到胞外。随着对数期的到来,大量乙酰 CoA、草酰乙酸被消耗利用以合成 ATP 来维持菌体快速繁殖,导致经由 TCA 生成的琥珀酸、柠檬酸含量不断增加,随着衰亡期的到来,培养液中琥珀酸、柠檬酸含量呈下降趋势,这可能是由于菌体在衰亡期对柠檬酸、琥珀酸的合成减少,且二者作为菌株利用效能较高的碳源被重新摄入胞内利用所致^[12]。对数期苹果酸被大量消耗,稳定期、衰亡期苹果酸含量变化趋势同柠檬酸、琥珀酸相似。随着培养时间的延长,乳酸含量不断增加,这同徐凯等的研究结果^[13]

一致。酒石酸含量随着培养时间的增加呈现先降低后增加趋势,与柠檬酸代谢趋势相反,这同杨文洲等的研究结果^[14]类似。

参考文献:

[1]刘再华,袁道先,何师意,等. 四川黄龙沟景区钙华的起源和形成机理研究[J]. 地球化学,2003,32(1):1-10.

[2]张金流,刘再华. 世界遗产——四川黄龙钙华景观研究进展与展望[J]. 地球与环境,2010,38(1):79-84.

[3]周绪纶. 关于四川黄龙钙华 CO₂ 成因的讨论[J]. 四川地质学报,2006,26(3):143-146.

[4]刘再华. 再论黄龙钙华的成因——回应周绪纶先生“黄龙钙华是热成因还是冷成因——高寒岩溶气源之一”一文[J]. 中国岩溶,2008,27(4):388-390.

[5]温志峰,钟建华,李 勇,等. 叠层石成因和形成条件的研究综述[J]. 高校地质学报,2004,10(3):418-428.

[6]韩作振,陈吉涛,迟乃杰,等. 微生物碳酸盐岩研究:回顾与展望[J]. 海洋地质与第四纪地质,2009,29(4):29-38.

[7]邢智峰,齐永安,郑 伟,等. 从微观角度认识微生物席在中元古代的繁盛——以豫西云梦山组为例[J]. 沉积学报,2011,29(5):857-865.

[8]唐鑫萍,黄文辉,邓宏文,等. 山东平邑盆地古近系湖相微生物碳酸盐岩形成机理[J]. 古地理学报,2012,14(3):355-364.

[9]Kenward P A,Goldstein R H,González L A,et al. Precipitation of low-temperature dolomite from an anaerobic microbial consortium: the role of methanogenic Archaea [J]. Geobiology, 2009, 7 (5): 556-565.

[10]Tong H, Ma W T, Wang L L, et al. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a *L*-aspartic acid inducing process [J]. Biomaterials, 2004, 25 (17): 3923-3929.

[11]周雪莹,杜 叶,连 宾. 不同培养条件对胶质芽孢杆菌诱导碳酸钙晶体形成的影响[J]. 微生物学报,2010,50(7):955-961.

[12]张 奇,邹 昆,徐 旭,等. 替考拉宁发酵液中有机酸的 HPLC 定性定量分析[J]. 中国抗生素杂志,2010,35(5):366-369.

[13]徐 凯,王 营,崔玉波,等. 谷氨酸发酵过程不同溶氧水平产有机酸[J]. 中国调味品,2007(1):41-44.

[14]杨文洲,薛永常,农晓帆,等. 柠檬酸对啤酒酵母 TCA 循环中有机的影响[J]. 大连轻工业学院学报,2007,26(4):313-315.