

題目：桿菌屬細菌在有機農業應用之開發

編號：NSC- 88-2316-B-002-007-B19-

主持人：國立台灣大學教授 徐源泰

中文摘要：

永續經營為二十一世紀農業生產之重要趨勢，其中有機農業的為落實永續經營的主要方法之一。在有機農業中，使用堆肥減少化學肥料、殺蟲殺草劑的使用以減低對環境的衝擊，及重複利用生質源以減少對環境的過度開發被視為最重要的課題。土壤中自然存在的枯草桿菌屬細菌由於具有可調節微生態環境以促進植物生長，分泌拮抗物質以保護植物免於病蟲害，與具備強力分解酵素以循環利用有機廢棄物等優點，被視為有機農業實施的重要材料。惟自然存在的枯草桿菌屬細菌之各種功能有其應用上的限制。

本計劃即針對上述問題，從分子生物、微生物生態生理方面著手改良枯草桿菌屬細菌之有機生質源分解利用能力以用為開發農業廢棄物為有機農業栽培介質。在研究計畫中，已分別完成桿菌屬細菌表現與分泌載體構築及纖維分解酵素基因次選殖，與桿菌屬細菌對作物增產應用之評估等工作。

關鍵字：桿菌屬細菌、有機農業、增產菌

英文摘要

Sustainable operation is the trend of 21st century agriculture. Among these, organic agriculture is the most promising sector. How to reduce the use of chemical fertilizer and pesticides to reduce the environments impacts and how to recycle the organic biomass to reduce the over-development becomes the most important tasks in organic agriculture operation. *Bacillus spp.* exist naturally in soils can promote plant growth by adjustment of micro-environment, protect plant from insects and diseases by secretion of antagonist materials, recycle organic wastes by secretion of strong hydrolysis enzymes. However, certain limitation in wild type *Bacillus spp.* capability retards their applications.

During the study, we have constructed some useful vectors and sub-cloning of cellulase genes, evaluated the growth-promotion effects of *Bacillus spp.* and mix the composts, growth-promoting and plant protection *Bacillus spp.* co-developed by this group projects and use in the greenhouse and mountain farm to evaluate the accomplishment.

Key Words: *Bacillus spp.*, Organic agriculture, growth promotion bacterial

計畫緣由與目的

農業生產、食品加工與城市廢棄物為最大宗可再循環之有機生質源，其中來自動物部份如使用豬糞尿等動物排泄廢棄或屍體做物為土壤肥料的應用，早已行之有年，惟近認為可能有重金屬、抗生素、與病原菌等殘留污染的隱憂，已有許多國

家開始家設限與管制 (Benckiser & Shimarmata, 1994)。植物方面由於多含複雜、難分解的巨分子碳水化合物，故以往應用較少多掩埋丟棄。據估計北美地區掩埋廢棄物中有30-40%為有機物 (Envirowaste, 1996)，易造成地下水源的污染。為減少對環境的衝擊及掩埋場的找尋日益困難，已有許多商業公司利用微生物分解而成堆肥用於苗圃、高爾夫球場等，一方面可收取來自政府的廢棄物清理費，另一方面發酵成的堆肥又可販賣獲利。據估計，光北美地區有關環境的產品與服務市場每年已達70億美金 (Envirowaste, 1996)。

在一般固態廢棄物堆肥發酵操作時，桿菌屬細菌可佔高達全微生物相中87%之多 (Strom, 1985)，其中主要的種類為 *B. circulans*, *B. staerithermophilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. shaericus*, *B. subtilis* 等。國外的一些例子顯示桿菌屬細菌可成功的用於轉換黃豆粉 (Kubo et al., 1994)、橄欖油生產 (Tomati & Galli, 1992) 等廢棄物為植物肥料。一般而言，桿菌屬細菌雖有相當強的蛋白質分解酵素系統，但巨分子碳水化合物分解能力則遠較芽孢桿菌及真菌等微生物為差。在前例黃豆渣粕的應用中即主要為利用 *B. circulans* 與 *B. steatothermophilus* 之耐熱蛋白質分解 以提供氨、胺基酸、短 等氮肥。

纖維素是地球上來自植物生質之最大宗碳水化合物，其合成率可達到每年四百億 (Coughlan, 1985) 到兩兆噸 (Alfani & Cantarella, 1987) 以上。因此，纖維的分解在碳源的生物循環及再利用上扮演著重要的角色。農產廢棄物中纖維含量約佔38-42%，半纖維31-34%，木質素10-13% (Ladisich, 1983)，均難以在自然中有效快速分解，故如能適當地運用纖維類分解酵素，將對廢棄物的發酵與再利用處理上有很大的幫助。

土壤中主要由微生物群主導的複雜微生態相會嚴重影響植物的生長良窳，其中會形成內生孢子的桿菌屬細菌更是左右微生態相的主力。不同的微生物群藉由分泌拮抗物質殺滅或干擾植物病蟲、分泌多種酵素分解巨分子生質以幫助植物獲取養分、分泌特定激素促進植物生長、族群相間生長競爭而調整土壤微環境組成、或以特殊方式與宿主共生等，種種機制間也會互相影響消長。如來自堆肥的土壤菌 *B. subtilis* NB22 可抑制20種植物病原真菌與8種植物病原細菌，其無菌培養液 (cell-free culture filtrate) 雖僅能抑制其中11種真菌與2種細菌，但拮抗能力反而更高 (Shoda & Ano, 1994)，而拮抗能力又受土壤酸鹼度影響。土壤中營養環境 N-P-K (氮可為電解質以離子化土壤中水而傳輸礦物質進入植物並增加植物綠度；磷決定植物的礦物質含量並使果實較甜；鉀決定植物的強壯性如枝葉的厚度與果實的大小及數目等) 除可藉由堆肥改變也深受微生物影響。而碳源除提供植物生長之必須外，亦負責土壤保水與提供微生物生長之必需。經由與微生物的交互作用，有機碳可提供吸附 (chelating) 礦物質的功能，這在植物生長是必需的，否則未吸附的微量元素很快即會流失，例如未經吸附的無機鐵在土壤中很快即轉為不溶性而無法為植物利用。有機碳亦可藉由對根生長的促進而提高種子發芽速率。

長久以來，農業界即發現基於一些未知的機制，桿菌屬細菌可促進作物生長，其原因除拮抗機能外，最主要的應是改變作物根系微環境與分泌生長促進物質 (Chanway & Holl, 1991)。主要使用的菌種包括 *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, 與 *B. polymyxa* L5, L6-16 等。國外的一些研究指出作物種子、苗木 (seedlings)、或栽培介質如泥炭蛭石土 (peat-vermiculite medium) 等在栽培前浸泡於桿菌屬細菌配製液中，可顯著增加小麥 (Chanway et al., 1988; Kucey,

1988)、玉米(Berge et al., 1990)、穗果類植物(Chanway et al., 1991; Holl & Chanway, 1992)等之種子生成苗木率、根重、根表面積、枝高、枝重等；其中幼苗生長率甚可提高2.38倍(Chanway, 1995)。大陸地區亦將此類「增產菌」的開發列為國加級計劃如國家豐收計劃、火炬計劃、星火計劃與國家級重點推廣項目等。惟增產菌之開發有相當地域特異性，不同作物、栽培介質與栽培區域均會影響最適桿菌屬細菌族群相之組成(Chanway et al., 1991; Holl & Chanway, 1992)。

本計劃於是即擬針對上述問題及發現，從分子生物、微生物生態生理方面著手改良桿菌屬細菌之有機生質源分解利用能力以用為開發農業廢棄物為有機農業栽培介質。

結果與討論

在桿菌屬細菌表現與分泌載體系統之構築策略，是應用前人選殖 *B. licheniformis* amylase (*amyBL*)及 *B. subtilis* neutral protease (*npr*) 的 signal sequence, 並以 neutral protease 為 marker, *amyBL* 的 signal sequence 長 29 a.a., 較一般 *E. coli* signal peptide 為長，但具典型 G(+) signal peptide 特徵，即先端為 positive charged 跟隨一段疏水性胺基酸。一般 *B. subtilis* 對數生長期 conserved promoters sequence 為 TTGACA, TATAAT, *amyBL* 為 TTGTGA, TACAAT 為生長中後期高強度啟動子，故與 *npr* 同選用為分泌序列(圖一)。因我們採用的宿主為 protease deficient mutant DB430 (*B. subtilis* DB430, *trpC2 npr apr epr bpf ispI*)，故使用 protease 當做抗生素外的第二 marker 的好處為，可十分經濟且容易地自 milk plate 上以 halo 刪除 self-ligation 的干擾。

我們曾陸續選殖或測試過的所謂 cellulase 包括 *Trichoderma reesei* 的 CBHI, CBHII, *Cellulomonas fimi* 的 CelD, *Clostridium thermocellum* 的 Cels 及 *C. cellulovorans* 的 CBP, EngB, EngC, EngD 等。基本上，主要都是不同受質種類及活性的 cellulobiohydrolase, exoglucanase 及 endoglucanase 之組合。傳統分類上，cellulobiohydrolase 是從纖維素非還原端切出纖維二糖，對修飾過纖維如 CMC 等無明顯活性，但對高度 hydrogen bond ordered 纖維如 Avicel, cotton fiber 等有活性；endoglucanase 則對 CMC 等有高度活性，但不易分解 hydrogen bond ordered cellulose，且產物除纖維二糖外亦包括葡萄糖。實驗上，在對從大腸桿菌中表現的這些重組基因產物的測試中，我們發現來自 *C. cellulovorans* 的 EngB 及 EngD 對多種受質包括 cellulose (microgranular, fibrous, and microcrystalline forms), avicel, carboxymethylcellulose, xylan, laminarin, mannan, lichenan, PNPC, PNPG, PNPX 等，均有相當活性，頗符合日後在有機農業應用的目標，而 CBP (cellulose binding protein)有強大纖維分解協力(synergistic)作用，更可提供為多種酵素之 ligand, 故選為目標基因。利用三組 in-frame 引子(圖二)分別 PCR 出 *engB*, *engD*, *cbp* 片段，並以 *Bam*HI, *Eco*RI 切位殖入 pWSV1 及 pWSV9 中，分別成 pWSBB5, pWSBD3, pWSBC4 及 pWSBB95, pWSBD93, pWSBC94 等。

經多次嘗試，最後引子設計為在 vector 利用 *Sal*I, *Eco*RI 限制酶切位，insert 利用 *Nco*I, *Eco*RI 限制酶切位，而在 adaptor 部分則安排其上含有 *Nco*I, *Sal*I 之切位。即 adaptor-I：5' TCGACCATCACCATCACCATCACATCGAGGGAA GGGC3' a 37-mer DNA Oligonucleotide 及 adaptor-II：5'CATGGCCTTCCCT

CGATGTGATGGTGGTGGTGGTGG3' a 37-mer DNA Oligonucleotide 所組成。在 adaptor 設計中並包括一段 6xHis Tag 以便日後之純化使用，有一段 ile-glu-gly-arg 之胺基酸片段，以便日後若融合蛋白質前端引導之酸胺基酸影響而失去活性時，便可利用 factor Xa 切除多餘之胺基酸片段。

如圖二所示，次選殖之步驟為將純化之 pEB (*Sal*I, *Nco*I)-5,690bps、pED (*Sal*I, *Nco*I)-5,907bps 基因片段分別與 adaptor (*Sal*I, *Nco*I)-37bps，以 1:100 之莫耳比進行接合反應，並轉型至 *E. coli* BL21 (DE3) 中。在 LB+Ap plate 上各挑選 16 個新轉形株，分別命名為 pEWB1~16, pEWD1~16，以快速篩選法 (Quick screening) 並經電泳鑑定結果與預期無誤 (圖三、四)。由於原 promoter 已破壞，此二過渡型轉形株並無纖維素水解酵素活性，此設計亦方便差別性選殖策略。

完整的枯草桿菌含纖維分解酵素單元基因表現質體 pWSB、pWSD 之構築如圖五所示。即先將已確定無誤的 pWEB、pWED 質體，各自以 (*Eco*R I + *Sal* I) 進行大規模酵素切位，以 QIA quick Gel Extract Kit 分別回收 pWEB (*Eco*R I + *Sal* I)-1967 bp、pWED (*Eco*R I + *Sal* I)-2236 bp 片段；vector 部分，則以限制酶 (*Eco*R I + *Sal* I) 大規模之切取，並以回收 pNC3 (*Eco*R I + *Sal* I)-4213 bp 片段。將 insert 與 vector 莫耳比 3:1 進行接合反應，並純化及濃縮 DNA 後，轉型至 *B. subtilis* (DB430)，以含 kanamycin 之 LB 培養基篩選，所得之新的枯草桿菌表現質體分別命名為 pWSB1-7, pWSD1-3。此等新轉形菌株於 LB+CMC 培養基上經剛果紅染色試驗，挑選酵素活性最強者並以各種限制酶確認 (圖六、七) 後認定及保留。另分別以破碎菌體及養液等在 LB+CMC 培養基上以剛果紅染色試驗 (圖八)，顯示此新構築設計前端之胺基酸並不影響酵素活性，且顯示多數酵素活性以分泌至胞外，完全符合預期理想。

至於轉形後所含質體上之外來基因對宿主本身的生長影響，可由圖九之生長曲線試驗顯示，並不明顯在酵素活性實測方面，EngB 活性原先於 *E. coli* 中未經 IPTG 誘導時，經繁複破碎菌體後，僅得菌體內每 16.3 unit/100 mL，經 IPTG 誘導後為 53.6 unit/100 mL。而在本年度試驗中所構築之 pSWB(DB430)，僅 100 mL 培養所得菌液，即已有為 55.3 unit。顯示本構築，將 EngB 以枯草桿菌來表現，在不需要誘導的情形下，在菌液中所得的酵素活性，已比以經 IPTG 誘導之大腸桿菌所得的酵素活性來的高，在應用上可節省誘導物 IPTG 之花費，且可省去破碎細胞之複雜步驟，更提高酵素純化之效率。

以桿菌屬細菌為主要成份之作物增產菌，已廣受重視。本計畫以所構築之菌種為增產菌，並比較日本的「SAION-EM」系列，大陸的「益微」系列，美國的「Bio-System MS」系列，及本土蒐集的微生物製劑為對象，分別進行增產效應、堆肥試製、及有機栽培介質做為溫室與田間生長挹注知試驗 (表 1-3)。以鳳山種小白菜為例說明，以沙土及內含蛭石、真珠石、泥碳土之根基旺為栽培介質，以 128 格育苗盆 (15 X 15, 30 X 30, 40, 22.5: 底面(mm), 表面(mm), 高度(mm), 體積(ml/格)及 0107 (600 mm X 310 mm X 35 mm) 育苗盤為栽培容器。結果顯示未使用增產菌之對照組平均株高株重分別為 167.9 mm 及 9.35 gm；不同增產菌處理者之株高株重分別在 191.2-225.4 mm 及 10.80-14.56 gm 之間。其中又以本土篩選及構築者者及大陸的益微系列效果較好，可能與土壤微環境水土適應性有關。進一步分離鑑定其中菌相及計算菌數，發現增產效果與實驗構築菌及 *B. subtilis* 所佔比例量呈明顯正相關，與 *B. cereus*, *B. megaterium* 亦有相關性，與其他菌種包括酵母菌、乳酸菌、光合成菌類等較無相關性，此等結果與前人研究相符也符合我們所預期。

計畫成果自評：符合預期進度與結果

參考文獻

- Alfani, F. & Cantarella, M. 1987. in *Biotechnology of Waste Treatment and Exploitation*. eds. Sidwick, J.M. & Holdom, R.S., Ellis Horwood, UK.
- Aon, T., Kobayashi, A., & Shoda, M. 1990. Transformation of *B. subtilis* NB22 with treatment by alkali cations. *Biotechnol. Lett.* 12:99-105.
- Benckiser, G. & Simarmata, T. 1994. Environmental impact of fertilizing soils by using sewage and animal wastes. *Fertil. Res.* 37:1-22.
- Beguín, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:219-248.
- Bejuin, P., Millet, J., & Aubert, J.P. 1992. Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: from manure to molecular biology. *FEMS Microbiol. Lett.* 79:523-528.
- Berge, O., Fages, J., Mulard, D. & Balandreau, J. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. *Symbiosis* 9:259-266.
- Cavedon, K., Leschine, S.B., and canal-parola, E. 1990. Cellulase system of a free-living, mesophilic *Clostridium* (strain C7). *J. Bacteriol.* 172:4222-4230.
- Chanway, C.P. 1995. Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growth-promoting *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 27:767-775.
- Chanway, C.P. & Holl, F.B. 1991. Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. *Can. J. Bot.* 69:507-511.
- Chanway, C.P., Nelson, L.M. & Holl, F.B. 1988. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 34:925-929.
- Chanway, C.P., Radley, R.A. & Holl, F.B. 1991. Inoculation of conifer seed with plant growth promoting *Bacillus* strains caused increased seedling emergence and biomass. *Soil Biol. Biochem.* 23:575-580.
- Coughlan, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3:39-109.
- Edman, P., and Henschen, B. 1975. *Protein sequencing Determination*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1975, pp.232-279.
- Envirowaste. 1996. <http://www.Envirowaste.com/overview.html/>
- Foong, F., Hamamoto, T., Shoseyov, O., and Doi, R.H. 1991. Nucleotide sequence and characteristics of endoglucanase gene *engB* from *Clostridium cellulovorans*. *J. Gener. Microbiol.* 137:1729-1736.
- Fujino, T., Bejuin, P., & Aubert, J.P. 1993. Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. *J. Bacteriol.* 175:1891-1899.

- Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C. & Warren, J. 1989. Structural and functional analysis of bacterial cellulase by proteolysis. *J. Biol. Chem.* 264:17802-17809.
- Gibson, R.M. & Errington, J. 1992. A novel *Bacillus subtilis* expression vector based on bacteriophage phi 105. *Gene* 121:137-142.
- Grabnitz, F., Staudenbauer, W.L. 1988. Characterization of two β -glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Lett.* 10:73-78.
- Hamamoto, T., Shoseyov, O., Foong, F., Doi, R.H. 1990. A *Clostridium cellulovorans* gene, *engD*, codes for both endo-beta- 1,4-glucanase and cellobiosidase activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:285-288.
- Hazlwood, G.P., Lauriw, J.I., Ferrira, L.M.A., & Gilbert, H.J. 1992. *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*: an alternative model for bacterial cellulase. *J. Appl. Bacteriol.* 72:244-250.
- Hazlwood, G.P., Romaniec, M.P.M., Davidson, K., Grepinet, O., Beguin, P. 1988. A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, β -glucosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:231-236.
- He, X.S., Shyu, Y.T., Nathoo, S., Wong, S.L., and Doi, R.H. 1992. Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 646:69-77.
- Holl, F.B. & Chanway, C.P. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* 38:303-308.
- Kubo, M., Okajima, J., Hasumi, F. 1994. Isolation and characterization of soybean waste-degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 243-247.
- Kucey, R.M.N. 1988. Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus C-11-25* on two wheat cultivars. *J. Appl. Bacteriol.* 64:187-196.
- Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M. and Tsao, G.T. 1983. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5:82-88.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Le Grice, S.F.J. 1990. Regulated promoter for high level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. *Meth. Enzymol.* 185:201-214.
- Poole, D.M., Morag, E., Lamed, R., Bayer, E.A., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. 1992. Identification of the cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS. *FEMS Microbiol. Lett.* 78:181-186.
- Ribbe, J & Nagarajan, V. 1992. Characterization of the secretion efficiency of a plant signal peptide in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 235:333-339.
- Sambrook-J., Fritsch-E.F., Maniatis-T 1989 *Molecular Cloning*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAS Institute Inc. (1987) *SAS/STAT User's Guide*, Version 6. SAS Institute Inc., Cary, N.C. U.S.A.
- Shimada, K., Karita, S., Sakka, K., & Ohmiya, K. 1994. Cellulase, xylanases, and their genes from bacteria. in Murooka, Y & Imanaka, T (eds.) *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- Shoda, M. & Ano, T. 1994. Basic analysis of *Bacillus subtilis* NB22 and its application to biological control. in Murooka, Y & Imanaka, T (eds.) *Recombinant*

- Microbes for Industrial and Agricultural Applications. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- Shoseyov, O., and Doi, R.H. 1990. Essential 170-KDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2192-2195.
- Tomati, U., Galli, E. 1992. The fertilizing value of waste waters from the olive processing industry. Dev. Agric. Manage. Ecol. p. 117-126. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyarylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS U.S.A. 76:4350-4354.
- Udaka, S. & Yamagata, H. 1994. Extremely efficient protein secretion system in *Bacillus brevis*. in Murooka, Y. & Imanaka, T. (eds.) Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- Wang, L.F., Hum, W.T., Kalyan, N.K., Lee, S.G., Hung, P.P., and Doi, R.H. 1989. Synthesis and refolding of human tissue-type plasminogen activator in *Bacillus subtilis*. Gene 84:127-133.
- Wang, W.K., & Wu, J.H. 1993. Structural features of the *Clostridium thermocellum* cellulase SS gene. Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 149-158.
- Wood, W.A., and Bhat, K.M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol. 160:87-112.
- Yunsura, D.G. & Henner, D.J. 1990. Use of *Escherichia coli trp* promoter to direct expression of proteins. Meth. Enzymol. 185:54-60.