

一株高环境适应性纤维素降解菌的筛选及鉴定

韩绍印, 席宇, 翁海波*, 朱大恒, 高建民, 杨德梁
(郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450052)

摘要: 从造纸厂废纸浆中分离到一株纤维素降解细菌 CP4, 在温度为 20~50 °C 和 pH 为 5~10 的条件下, CP4 能够快速生长并分泌纤维素酶。在 35 °C 和 pH 为 9 的条件下, 培养 8h 后 CP4 开始产酶, 培养 3d 后相对酶活为 5.43 mm/d。为确定 CP4 的分类学地位, PCR 扩增后测定其 16S rDNA 基因序列, 在 GenBank 中进行同源性比较, 并与一些相关细菌构建系统发育树, 结合其形态特征和生理生化特征, 初步鉴定为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。该菌环境适应能力高, 在纤维素类物质污染的治理中具有潜在的应用前景。

关键词: 纤维素降解菌; 筛选; 16S rDNA 序列; 鉴定

中图分类号: Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)12-0051-04

Screening and Identification of A Cellulolytic Bacterium with High Adaptability to Environment

HAN Shao-yin, XI Yu, WENG Hai-bo*, ZHU Da-heng, GAO Jian-min, YANG De-liang
(Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: A cellulolytic bacterium strain CP4 was isolated from waste paper pulp of a paper mill in Zhengzhou. It can grow rapidly and produce CMC enzyme on CMC media in conditions of pH 5-10 and temperature 20-50 °C. CMC enzyme was produced after 8 h culture at pH 8 and 35 °C, and the relative activity reached 5.43 mm/d after 3 d culture. For confirming the classification of CP4, morphological, physiological and biochemical characterization were applied and PCR was carried out to measure the gene sequence of 16S rDNA. The 16S rDNA of CP4 was compared with those in GenBank and the phylogenetic tree was constructed with related bacteria. Based on the above results, the strain CP4 was identified as *Bacillus megaterium*. Due to high adaptability to environment, CP4 will have a great potential to be applied in controlling the pollution of cellulosic material.

Key words: Cellulolytic bacterium; Screening; 16S rDNA sequence; Identification

纤维素是一种可再生资源, 地球上每年光合作用产生大于 100 亿 t 的植物干物质, 其中一半以上是纤维素和半纤维素^[1]。城市固体废弃物中也含有大量的纤维素成分, 纤维素类物质难于降解, 利用微生物的酶解作用, 解决环境污染问题, 甚至转化为能源已经成为当前研究的重点。目前已经分离了大量

纤维素降解菌^[2,3]。环境条件复杂多变, 许多纤维素降解菌生长缓慢, 很难用于环境的生物治理中, 因此筛选有效适应环境且分解效率高的纤维素降解菌并应用于环境污染的治理, 具有重要意义。笔者从郑州市某造纸厂的废纸浆中筛选和鉴定一株环境适应性较高的纤维素降解菌, 并对其生理生化特性, 以

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 河南省科技攻关计划资助项目(04240037); 河南省自然科学基金资助项目(0511030400)

作者简介: 韩绍印(1963-), 男, 河南驻马店人, 实验师, 主要从事环境微生物学研究。

通讯作者: 翁海波(1974-), 男, 河南濮阳人, 讲师, 博士, 主要从事分子微生物学研究。

及其对营养、温度和 pH 等环境因子的适应性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 样品采集

从郑州市某造纸厂的废纸浆中采集样品作为分离纤维素降解菌的材料。

1.2 试剂与培养基

Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、PCR 克隆载体 pMD18-T 购于 Takara 生物工程有限公司; 感受态细胞大肠杆菌 JM109 由郑州大学生物工程系保存。纤维素降解菌的筛选参考文献[4] 报道的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 刚果红培养基 (简称 CMC 培养基), 略有改变, 成分如下: K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.25 g, CMC-Na 2 g, 刚果红 0.2 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, pH 自然, 水 1 L, 固体培养基中琼脂含量为 1.2%。

1.3 纤维素降解菌的筛选

取 5 mL 采集样品溶于 45 mL 无菌生理盐水中, 充分振荡 30 min, 取 0.2 mL 样品涂布于 CMC 平板培养基上, 30 °C 恒温培养。平板培养 2~3 d 后, 挑取周围出现透明圈的菌落于 CMC 培养基上继续划线培养, 选取透明圈直径较大的菌落进行染色, 于 Nikon E-600 微分干涉显微镜下观察菌体形态, 用 Nikon Type950 数码相机成像系统拍摄照片。

1.4 温度和初始 pH 对分离菌株产酶的影响

将分离菌株涂布于 CMC 平板上分别于 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C 条件下培养 3 d, 测透明圈和菌落直径, 并计算 CMC 酶相对活性 $A = d/t$, 其中: A 为相对活性 (mm/d); d 为透明圈直径 (mm); t 为培养时间 (d)^[2]。分离菌株涂布于初始 pH 值分别为 4~10 的 CMC 平板上, 于 35 °C 条件下培养 3 d, 测量并观察透明圈的大小变化, 计算 CMC 酶的相对活性, 结果取 5 个菌落的平均值。

1.5 分离菌株生理生化特征检测

生理生化特征检测参照《常见细菌系统鉴定手册》方法进行^[3]。

1.6 16S rDNA 序列的 PCR 扩增及系统进化树的构建

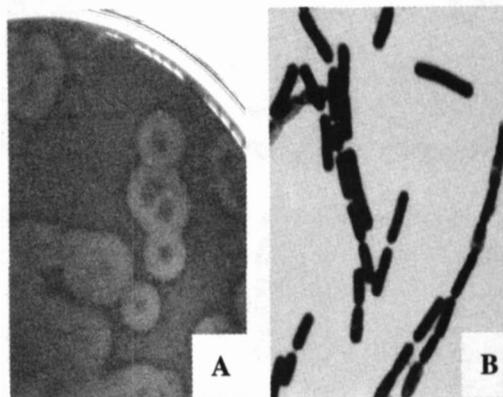
提取分离菌株基因组 DNA 作为 PCR 反应模板^[6], 采用细菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 其中正向引物 1 BSF8: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 的 16S rDNA 对应位置

为 8~27), 反向引物 2 BSR1541: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*E. coli* 的 16S rDNA 对应位置为 1541~1522)。PCR 反应体系 (25 μL): DNA 模板 1 μL, 10× Buffer 2.5 μL, 引物各 1 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, dNTP 1.5 μL, ddH₂O 17.8 μL; 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min, 然后进入 PCR 循环, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 6 min。PCR 产物电泳检测并切胶回收纯化, 纯化产物与克隆载体 pMD18-T 于 4 °C 过夜连接, 热冲击法转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 获取阳性转化子进行测序。扩增引物的合成和 16S rDNA 序列的测定均由上海生工生物技术有限公司进行。测序结果在 GenBank 中进行同源性比较, 选取 GenBank 中同源性较高的细菌 16S rDNA 序列, 采用 Clustal W 1.8 软件进行多序列匹配排列, 用 MEGA 3.1 软件采用邻接法构建分支系统进化树, 并通过自举分析进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及其培养特征

采集样品进行处理, 采用 CMC 培养基进行培养, 从 2006 年 5 月份采集于郑州市某造纸厂的废纸浆样品中筛选出一株菌落生长快, 透明圈比较大的菌株, 编号为 CP4, CP4 在 CMC 平板上培养 20 h, 结果如图 1(A); 在 LB 平板上培养 20 h 后, 菌落白色表面湿润, 边缘光滑, 菌体呈杆状, 两端顿圆, 中生芽孢, 其显微图片如图 1(B)。



A. 菌株 CP4 的 CMC 平板观察 (20h); B. 菌株 CP4 光学显微观察 (1600×)

图 1 CP4 的 CMC 平板照片和菌体显微观察

2.2 培养温度对菌株产酶的影响

菌株 CP4 可在较大温度范围内生长, 将 CP4 接种于 CMC 平板上, 在不同的温度下培养 3 d 后观

察,发现 CP4 可在 15~55 °C 范围内生长,在 30~40 °C 时生长良好,在 35 °C 时菌落直径最大,同时透明圈直径也最大,表明 35 °C 最适合 CP4 产酶,结果见表 1。当温度在 15 °C 以下和 55 °C 以上时,CP4 能够缓慢生长,菌落如针尖状,周围无透明圈,结果表明,CP4 是一株嗜温菌(mesophilic bacteria),最适生长温度范围比较大。

表 1 不同培养温度下的菌落直径、透明圈直径和相对酶活

项目	培养温度(°C)						
	20	25	30	35	40	45	50
菌落直径(mm)	1.8	3.5	5.1	6.3	4.6	2.5	1.0
透明圈直径(mm)	3.5	6.5	9.6	16.3	10.2	3.2	1.5
相对酶活(mm/d)	1.17	2.17	3.20	5.43	3.40	1.07	0.50

2.3 pH 对菌株产酶的影响

在 35 °C 条件下研究不同初始 pH 对 CP4 生长和产酶影响,结果如图 2。在测试的 pH 为 5~10 范围内,CP4 能够生长并产酶,其中当 pH 为 8~10 时,CMC 酶相对活性较高,最高达 5.43 mm/d;当 pH 小于 5 或者大于 10 时,CP4 虽能微弱生长,但不能产酶。结果表明,CP4 能够在较大的 pH 范围内生长,并且能够耐受碱性环境,在碱性条件下,产酶能力也比较高,这与耐碱细菌的生长特性相一致。试验过程中也发现,在 35 °C 和 pH 为 9 时,透明圈在培养 8h 时出现,这说明 CP4 产酶时间早。

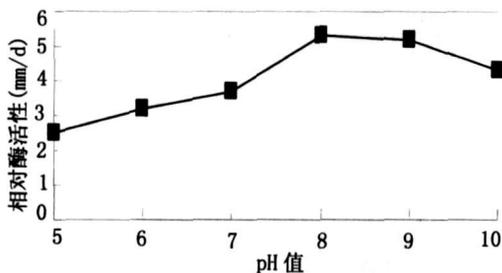


图 2 不同 pH 条件下 CMC 酶的相对活性

2.4 菌株生理生化特性鉴定

参考《常见细菌系统鉴定手册》对菌株 CP4 的生理生化特性进行测定,结果见表 2。从表 2 可以看出,CP4 可发酵利用多种碳源和氮源,这说明 CP4 碳源谱和氮源谱是比较广泛的,碳源谱和氮源谱广泛的菌株对环境的适应性是比较高的。

2.5 菌株 16S rDNA 序列的 PCR 扩增及序列测定

采用细菌的一对通用引物,以菌株 CP4 的总 DNA 为模板扩增出 1500bp 左右的 16S rDNA 片段,切胶回收并纯化,纯化 PCR 产物克隆到载体 pMD18-T 上,转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,

表 2 菌株 CP4 的生理生化特性

检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	+	生长温度(°C)	15~55
芽孢染色	+	最适 pH	8~10
氧化酶	+	酪素水解	+
接触酶	+	明胶水解	+
卵磷脂酶	-	淀粉水解	+
乳糖发酵	(+)	V-P 试验	-
柠檬酸盐利用	+	吲哚试验	+
丙酸盐利用	-	木糖产酸	(+)
酪氨酸利用	+	葡萄糖产酸	+
甘露醇产酸	+	葡萄糖产气	-
硝酸盐还原	+	阿拉伯糖产酸	-

注: + 阳性反应; - 阴性反应; (+) 迟缓阳性

获取阳性克隆子进行测序,获得 CP4 的 16S rDNA 部分基因序列,共 856bp,该序列已经登录到 GenBank,登录号为 EF010982。

2.6 菌株 16S rDNA 序列相似性比较及系统发育分析

将菌株 CP4 的 16S rDNA 部分基因序列在 GenBank 中以 BLAST 进行序列同源性比较,结果表明,CP4 与芽孢杆菌属的多个菌株具有同源性,同源性达 99% 以上,选取同源性较高的 11 株细菌,以一株荧光假单胞菌为外群,构建系统发育树,结果如图 3。CP4 与一株芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌的进化关系比较近,综合其形态特征和生理生化特性,初步把 CP4 鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* CP4)。

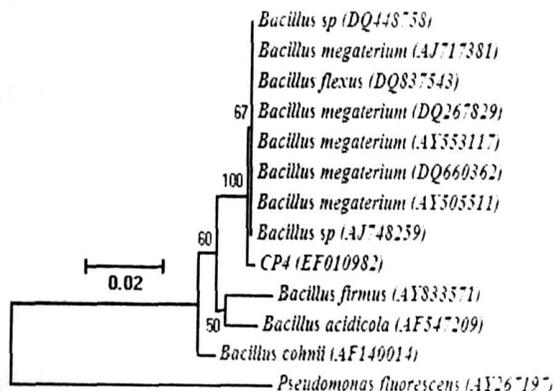


图 3 基于 16S rDNA 序列相似性的系统发育树 (括号内为序列登录号)

3 结论

菌株 CP4 是一株巨大芽孢杆菌,能够在较大的温度范围和 pH 范围内生长,分解利用多种碳源和氮源,并且产生高活力 CMC 粗酶,环境适应能力比

较高; CP4 能够耐受碱性环境, 在造纸厂的废水处理中具有潜在的应用价值; CP4 的良好环境适应性和产酶能力, 可作为制备高效微生物降解菌群的一个优良候选菌株; 以 CMC 为底物检测的为纤维素酶系的内切葡聚糖酶组分, 为在实践中有效应用 CP4, 还需对 CP4 纤维素酶组成及液体固体发酵条件做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Leschine S B. Cellulose degradation in anaerobic environments [J]. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49: 399—426.
- [2] 蔡燕飞, 李华兴, 彭桂香, 等. 纤维素分解菌的筛选及鉴

定 [J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(2): 68—70.

- [3] Lee R L, Paul J W, Willem H Z, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(3): 506—577.
- [4] Hendrick C W, Dolye J D, Hugley B A. New solid medium for enumerating celluloseutilizing bacteria in soil [J]. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61(5): 2016—2019.
- [5] 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.
- [6] 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.

(上接第 42 页) 正相关, 但与倒伏指数亦呈正相关, 且相关性很强, 这是一对矛盾, 说明单从粗纤维等某一方面对倒伏难以作出恰当评价。本研究试图探讨不同抗倒性品种的主茎理化特性之间的差异及其与倒伏的直接相关性, 由于倒伏问题比较复杂, 没有找出直接的显著相关结果, 要简捷地评价油菜的倒伏性, 要从理化、农艺和显微结构等多方面加强综合研究, 方可达到比较理想的研究结果。

参考文献:

- [1] 刘后利. 实用油菜栽培学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1987: 256—260, 538—539.
- [2] 张建, 陈金城, 唐章林, 等. 油菜茎秆理化性质与倒伏关

系的研究 [J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 28(5): 763—765.

- [3] 乔春贵. 作物抗倒伏的综合指标——倒伏指数 [J]. *吉林农业大学学报*, 1988, 10(1): 7—10.
- [4] 郭玉华, 朱四光, 张龙部. 不同栽培条件对水稻茎秆生化成分的影响 [J]. *沈阳农业大学学报* 2003, 34(2): 89—91.
- [5] 孙守钧, 裴忠有, 曹秀云, 等. 高粱抗倒的形态特征和解剖结构研究 [J]. *哲里木畜牧学院学报*, 1999, 9(1): 5—11.
- [6] Murthy B N, Rao M V. Evolving suit index for lodging resistance in barley [J]. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1980, 40: 253—261.
- [7] 朱新开, 王祥菊, 郭凯泉, 等. 小麦倒伏的茎秆特征及对产量与品质的影响 [J]. *麦类作物学报*, 2006, 26(1): 87—92.

欢迎订阅 2008 年《华北农学报》

《华北农学报》于 1986 年创刊, 由河北、北京、天津、山西、河南、内蒙古六省市农科院和农学会联合主办的大农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

本刊为中国科学引文数据库核心期刊、全国综合性农业核心期刊、中国自然科学核心期刊及中国农业核心期刊。曾荣获全国优秀科技期刊三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、全国农口学会优秀期刊奖、华北优秀科技期刊奖及河北省优秀期刊奖。

国内外公开发行, 国内统一刊号: CN 13—1101/S, 国际刊号 ISSN 1000—7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 192 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18—10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 邮失可补。请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编, 以免误投或无法投递。欢迎订阅、欢迎投稿。

地 址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮 编: 050051

电 话: 0311—87652166

E-mail: hbnxb@163.com 或 hbnxb@sohu.com