

纤维素分解菌的筛选及鉴定*

蔡燕飞¹, 李华兴¹, 彭桂香¹, 刘远金¹, 蔡爱华², 赵肃清³

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642 2 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006 3 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)



CAI Y F

摘要: 从自然界中筛选分离获得具有高效分解纤维素功能的一组混合菌株, 经分离纯化得 3 个菌株 D1、D2 和 D3, 利用 16S rDNA 测序鉴定, 这些菌株分别是克雷伯氏菌、假单胞菌和嗜麦芽窄食单胞菌, 比较各单个菌株及其相互混合的羧甲基纤维素 (CMC) 酶相对活性, 以及它们对滤纸和香蕉杆的分解效果, 发现各单一菌株对纤维素类物质均有一定的降解效果, 但混合菌群效果最好, 其 CMC 酶相对活性为 0.93 am/d, 说明多种微生物的协同作用有助于纤维素类物质分解。

关键词: 纤维素分解菌; 纤维素; 16S rDNA 测序

中图分类号: Q556 Q937 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2005)02-0067-04

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CELLULOSE-DECOMPOSING MIXED STRAIN

CAI Yan-fei¹, LI Hua-xing¹, PENG Gui-xiang¹, LIU Yuan-jin¹, CAI A-hua², ZHAO Su-qing³

(1 College of Resource and Environment South China Agricultural University, Guangzhou 510642 China;

2 Guangxi Institute of Botany, Guangxi Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006 China;

3 Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006 China)

Abstract A cellulose-decomposing mixed strain was isolated from natural habitats which contained *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. identified by 16S rDNA sequencing. By comparing the relative activity of carboxymethyl cellulose (CMC) enzyme and the effects on decomposing filter paper and banana plant stalks among each single bacteria and their mixed strain, it was shown that each strain had certain capability of decomposing cellulose, but the mixed strain behaved the best and the relative activity of CMC enzyme was 0.93 am/d. It indicated that synergistic effect among several microorganisms would accelerate the decomposition of cellulose materials.

Key words cellulose decomposing microorganism; cellulose; 16S rDNA sequencing

随着人口的迅猛增长, 能源危机、食物短缺、环境污染等问题越来越严重。如何使废弃物无害化、资源化已成为世界性亟待解决的问题。我国的纤维素资源非常丰富, 仅农作物秸秆一项, 每年可达 6~10 亿吨。虽然纤维素废弃物资源巨大, 但由于天然纤维素的复杂和难降解, 人们对它的开发和利用却十分有限, 大部分是自然腐烂或燃弃, 有些还造成环境污染 (例如焚烧), 这无疑是对自然资源的极大浪费。本研究针对木质纤维素废弃物降解慢的难题, 从堆肥、污泥等微生物栖息生境中分离筛选到一组纤维分解能力较强的混合菌, 对滤纸和香蕉种植废弃物的分解效果作了初步的探讨, 并用 16S rDNA 序列测定进行菌株鉴定, 以为纤维素降解研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

* 收稿日期: 2004-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400274); 国家“863”计划资助项目 (2001A A246023)

作者简介: 蔡燕飞 (1970-), 女, 湖南益阳人, 助理研究员, 博士, 从事固体废弃物降解研究; E-mail: yanfeika@scau.edu.cn

1.1.1 滤纸处理 滤纸用 1% 醋酸浸泡 24 h, 用碘液检查确定无淀粉后, 再用 2% 苏打水冲洗至中性, 凉干, 将处理后的滤纸剪成小条待用。

1.1.2 样品采集和处理 从自然界中采集朽木、土壤、半腐朽枝落叶、污泥等样品, 分别放入三角瓶中, 加入适量的生理盐水, 振荡 30 min, 然后吸取上清液 1 mL, 分别接种至 30 mL 的初选培养基中, 经过 7~15 d 的 30 °C 摇床培养和 2~3 次的富集纯化培养, 从平行的 30 个处理中选择滤纸条崩溃程度较高、崩溃速度最快和效果稳定的 N8 培养液进行固体分离纯化培养。

1.2 培养基

1.2.1 初选培养基 NaNO_3 0.5 g KClO 5 g K_2HPO_4 1.0 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (痕量), CaCl_2 (痕量), CuSO_4 (痕量), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.5 滤纸 0.3 g

1.2.2 分离培养基 PDA 培养基 (马铃薯 200 g 蔗糖 20 g 琼脂 16 g 水 1 000 mL)。

1.2.3 CMC 培养基 CMC-Na 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g KH_2PO_4 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g 蛋白胨 1 g 琼脂 16 g 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 测定方法

1.3.1 透明圈的测定 将分离的单个菌株及其混合菌分别点种于 CMC 平板上, 30 °C 培养 3 d 用 5 mg/L 刚果红染色 5 min, 倾去染液, 测透明圈直径, 并计算 CMC 酶相对活性 $A = d/t$, 式中: A 为相对活性, cm/d d 为透明圈直径, cm ; t 为培养时间, d 。

1.3.2 对滤纸的分解效果测定 将各菌株接种到以滤纸为唯一碳源的液体培养基中, 30 °C, 在转速为 110 r/min 的摇床培养 5 d, 观察滤纸的崩解效果, 以“+”的多少来表示滤纸崩溃程度, “+”越多, 说明该菌株的降解效果越强。

1.3.3 对香蕉杆的分解效果测定 将香蕉杆切成 3 cm 左右, 将各菌株分别接种至以香蕉杆为唯一碳源的液体培养基中, 在转速为 110 r/min 的摇床 30 °C 下培养 4 d, 用滤纸过滤, 80 °C 烘至恒重, 计算降解后每克香蕉杆残重。

1.4 菌种鉴定

采用 16S rDNA 序列分析方法, 具体测定方法如下。

1.4.1 DNA 提取 将待测菌株在 PDA 培养基上培养 36 h, 用接种环取 3~4 环放入到 1.5 mL 离心管, 加 200 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0) 溶液, 混合均匀, 加 5 μL 溶菌酶 (10 mg/mL), 在 37 °C 下温育 30 min, 然后加入 300 μL 的 5% 肉桂酸钠, 混合均匀后, 在 55~60 °C 下温育 30 min, 加入等体积饱和酚, 混匀后于 14 000 r/min 下离心 8 min, 收集上清液于离心管中, 加入等体积氯仿, 混匀后于 14 000 r/min 下离心 8 min, 收集上清液于离心管中, 于其中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 值 5.8) 和等体积的无水乙醇, 缓慢倒置混匀以沉淀 DNA, 再于 14 000 r/min 下离心 8 min, 弃去上清液, 得到的沉淀 DNA 加入 70% 乙醇混匀后于 14 000 r/min 下离心 8 min, 弃去上清液, 于 37 °C 下干燥 5 min 以去除残留乙醇, 最后于其中加入 TE 60 μL , 于 -20 °C 冰箱中保存待用。

1.4.2 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 得到的 DNA 模板用 25 f 和 1492 r 引物 (27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, 所有 PCR 反应均在 50 μL 标准反应体系中进行, 其中含有 5 μL 缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L MgCl_2 , 500 mmol/L KCl, pH 值 8.3), 1 $\mu\text{mol/L}$ 混合 dNTPs, 每一引物均为 20 $\mu\text{mol/L}$, 1 U Taq 酶, 1 μL 模板 DNA, 加无菌超纯水 (MilliQ) 至 50 μL , 于 PCR 仪上按 97 °C 先变性 3 min, 然后按 97 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.4.3 扩增产物的纯化 采用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 切取扩增产物条带浸于 TE 缓冲液中, 70 °C 水浴加热 5 min 使胶融化, 在 4 °C 于 13 000 r/min 下离心 2 min, 于上清液中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 值 5.2) 和等体积的无水乙醇, 于 -20 °C 下放置 2 h 以沉淀 DNA, 以下操作同上述 DNA 提取过程。获得的纯化 DNA 用于下一步测序。

1.4.4 16S rDNA 序列测定 用引物 342 f 进行序列测定。由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

2 结果与讨论

2.1 纤维素降解菌的分离筛选

采用以滤纸为唯一碳源的培养基从堆肥、污泥、朽木等自然界中筛选纤维素分解菌, 经多次富集增殖培养后, 获得 10 多组具有纤维素降解功能的微生物, 其中混合菌株 N8 具有很好且稳定的分解纤维素效果, 在以滤纸为碳源的液体培养基中发酵 7 d, 滤纸全部崩解, 并没有絮状沉淀, 形成完全溶解的黄色稍粘稠发酵液。

选择合适的分离培养基可大大降低工作量, 本研究发现选择滤纸作碳源的无机盐溶液较好, 易观察滤纸溃烂, 并有大量菌丝球出现, 同时滤纸是天然纤维素, 较适合用于筛选降解纤维素类废弃物分解菌的初选和增殖培养基。

将 N8 混合菌株用 PDA 平板进行分离纯化得到单个菌株 D1、D2、D3, 比较单个菌株以及相互混合对滤纸分解的效果 (见表 1), 结果表明, 各菌株单独培养对滤纸均有一定的分解效果, 但远不如混合的效果好, 由此说明, 3 株菌株之间有很好的协同效应。

2.2 不同菌株对羧甲基纤维素钠的分解能力

将单个菌株以及相互混合分别点种到 CMC 固体培养基上, 30℃ 培养 3 d, 所有菌株都能够在 CMC 培养基上生长, 其中 D1、D1D2、D1D2D3 生长快, 菌落较大; D2、D3 和 D2D3 生长相对慢些。经过刚果红染色后各菌株在平板上形成透明圈大小如表 1 所示。D1D2D3 的透明圈直径最大, 为 2.8 cm, CMC 酶相对活性 A 为 0.93 cm/d, 由此说明混合菌株比单个菌株具有高的纤维素酶活性。

2.3 不同菌株对香蕉杆的分解能力

香蕉是著名的岭南特产水果, 据不完全统计, 每年每亩香蕉种植废弃物达 3 t, 香蕉杆纤维素含量较多, 难以自然腐烂, 大都抛弃河涌或道路, 污染环境。因此应用纤维素降解菌株对香蕉种植废弃物进行快速降解意义重大, 不同菌株对香蕉杆的分解效果如表 1, 从表 1 可看出, 各菌株对香蕉杆具有一定的降解效果, 以 D1D2D3 的分解效果最好。

表 1 不同菌株的纤维素酶活性及对滤纸和香蕉杆的分解效果¹⁾

Table 1 Comparing the relative activity of CMC enzyme and the effects on decomposing filter paper and bananas plants stalk among different strains

菌株 strains	滤纸溃烂状况 decomposing filter paper	透明圈直径 / cm diameter of transparent circle	CMC 酶相对活性 A / (cm · d ⁻¹) relative activity of CMC enzyme	香蕉杆残质量 / g residual of banana plant stalks
D1	+++	1.60 ± 0.06	0.53 ± 0.02	0.523 ± 0.028
D2	+++	1.03 ± 0.09	0.34 ± 0.03	0.833 ± 0.023
D3	++	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.680 ± 0.012
D1D2	+++	2.03 ± 0.09	0.68 ± 0.03	0.603 ± 0.019
D1D3	+++	1.40 ± 0.06	0.47 ± 0.02	0.527 ± 0.023
D2D3	++	1.10 ± 0.12	0.37 ± 0.04	0.630 ± 0.031
D1D2D3	++++	2.80 ± 0.00	0.93 ± 0.00	0.163 ± 0.037

1) 数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差 the data are average of 3 replicates ± standard error n=3 2) ++++ 滤纸完全崩解成均匀粘稠的液体 filter paper completely decomposed into homogeneous liquid +++ 滤纸断裂, 振摇成均匀糊状 filter paper broken into homogeneous paste by shake ++ 滤纸断裂, 振摇成有碎片糊状 filter paper broken into shruy paste + 滤纸断裂, 振摇不成糊状 filter paper broken into shruy + 滤纸不断裂, 但有毛边 filter paper not broken but flocky

2.4 菌株鉴定

由于核酸分析技术和细菌鉴定观念上进步, 使能根据 16S rDNA 序列比较推测细菌间进化关系, 并进而对未知细菌进行鉴定和检测。本研究用 16S rDNA 序列分析结果表明, D1 与 *Klebsiella pneumoniae* 的 16S rDNA 序列有 98% 的同源性, D2 与 *Pseudomonas sp.* 的 16S rDNA 序列有 99% 的同源性, D3 与 *Stenotrophomonas maltophilia* 的 16S rDNA 序列有 99% 的同源性。因此可初步得出 D1 是克雷伯氏菌属菌, D2 是假单胞菌属菌, D3 是嗜麦芽窄食单胞菌。

前人研究表明, 假单胞菌属不仅能分解纤维素, 而且对二氯酚、阿特拉津等有机废弃物有降解功

效^[2-3], 克雷伯氏菌属有固氮和分解纤维素功能的报道^[4], 本研究与之一致, 嗜麦芽窄食单胞菌对植物病害具有拮抗作用^[5], 但未见其相关纤维素分解方面的报道, 本研究发现具有分解纤维素功能的嗜麦芽窄食单胞菌。同时此 3 种菌混合处理比单一菌种的降解效果显著, 说明这些微生物相互间具有较强的协同作用, 其作用机理有待进一步探讨。

3 结论

3.1 研究表明, 选择滤纸作碳源的无机盐溶液是较好的纤维素分解菌初选和增殖培养基, 简单易行。筛选的混合菌株具有较强的协同作用, 对纤维素有较好降解能力, 对于我国农村大量秸秆和城市有机废弃物的处理将有非常广阔的前景。

3.2 应用 16S rDNA 序列分析的分子生物学技术即, 总 DNA 提取、PCR 扩增、16S rDNA 测序及序列分析等初步鉴定降解纤维素混合细菌。结果分别是克雷伯氏菌、假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌, 其中嗜麦芽窄食单胞菌是本研究首次报道具有分解纤维素的功能。

致谢: 特别感谢谭志远教授和张新明副教授的精心指导和帮助。

参考文献:

- [1] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究 [J]. 林产化学与工业, 2002, 22(1): 47-51.
- [2] 魏桃员, 张素琴, 邵林广, 等. 一株纤维素降解细菌的分离及特性研究 [J]. 环境科学与技术, 2004, 27(5): 1-2 39
- [3] 蔡宝立, 黄今勇. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 7-11
- [4] 顾小平, 吴晓丽. 毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究 [J]. 林业科学研究, 1994 (6): 618-623
- [5] 陈志谊, 许志刚, MEW T W. 水稻纹枯病拮抗细菌的种群分布及其生物多样性研究 [J]. 植物病理学报, 1999, 29(2): 97-103.

学会园地

关于征集“林产化工与生物质产业研讨会”论文的通知

生物质产业是利用农作物、树木和其他植物及其残体、畜禽粪便、有机废弃物等可再生的有机物质为原料, 通过工业性加工转化生产化工产品、生物燃料和生物质能源以及生物基产品的一个新兴产业。林产化工与生物质产业有着深刻的渊源关系。为贯彻中央关于树立科学发展观和经济可持续发展的伟大战略目标, 结合我国林产化工和生物质产业发展的新形势, 促进我国林产化学工业的发展, 中国林学会林产化学化工分会将于 2005 年 10 月在湖南省张家界市召开“林产化工与生物质产业研讨会”, 现将有关征集论文事项通知如下:

一、征集论文范围及内容

1) 发展生物质产业的重要性、建议和设想; 2) 林产化工在生物质产业发展中的地位和作用; 3) 生物质原料热化学转化技术和产品; 4) 农林生物质原料水解技术和产品; 5) 木材制浆造纸及其副产品综合利用; 6) 树木提取物及分泌物的化学与利用; 7) 生物质材料的开发与应用; 8) 林产香料、油脂、药物和生物活性物质的开发和利用; 9) 能源树和能源林的选育、引种、栽培和利用。

二、论文要求

本次会议论文将择优在《林产化学与工业》期刊 2005 年增刊上发表, 美国 EI 收录。论文具体要求见《林产化学与工业》征稿简约(见本期 94、98 页), 交论文需附软盘。论文截止日期为 2005 年 6 月 20 日。

三、联系地址

论文请寄南京市锁金五村 16 号 林产化学工业研究所《林产化学与工业》编辑部, 稿件请注明“应征论文”。

电话: 025-85482493 85482490 邮编: 210042 传真: 025-85413445

E-mail: lchx@chinajournal.net.cn http://lchx.chinajournal.net.cn

中国林学会林产化学化工分会