

一株纤维素降解菌的分离和鉴定

周思才, 石家城, 高瑞佳, 艾爽, 罗鹏, 王中丽, 孙劲*

(西昌学院资源与环境学院, 四川 西昌 615013)

摘要:为得到降解纤维素能力较强的细菌,以腐殖土壤为菌株来源筛选、分离纤维素降解细菌。对所取土样稀释一定比例进行涂布平板,以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源培养,用刚果红染色的方法筛选有透明圈的菌株,得到一株编号为YBX-52的纤维素降解细菌。在产酶培养基中以30℃培养48h,用DNS法测得滤纸酶活力(FPA)为221.75 μmol/min、羧甲基纤维素酶活力(CMC)为274.56 μmol/min。以16SrDNA通过序列对比,构建YBX-52系统发育树,结合其生理生化特征将其鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

关键词:纤维素酶;苏云金芽孢杆菌;分离;鉴定

中图分类号:S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2020)04-0005-03

Isolation and Identification of a Cellulolytic Bacterium

ZHOU Sicai, SHI Jiacheng, GAO Ruijia, AI Shuang, LUO Peng, WANG Zhongli, SUN Jin*

(School of Resource and Environment, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China)

Abstract: In order to obtain cellulose-degrading bacteria, humus soil is used as the strain source to screen and isolate cellulose-degrading bacteria. A cellulose degrading bacterium numbered YBX-52 is obtained from culturing CMC-Na as the sole carbon source on a plate coated with soil sample diluted in a certain proportion and screening the strain with transparent circle by Congo red staining. The filter paper enzyme activity (FPA) measured by DNS method is 221.75 μmol/min and the carboxymethylcellulose enzyme activity (CMC) is 274.56 μmol/min when cultured at 30℃ for 48 h in enzyme-producing medium. The YBX-52 phylogenetic tree is constructed by sequence comparison with 16SrDNA, and identified as *Bacillus thuringiensis* according to its physiological and biochemical characteristics.

Keywords: cellulose; *Bacillus thuringiensis*; isolation; appraisal

0 引言

随着社会的进步,科技的发展,农业种植规模的扩大,随之带来的秸秆也越来越多。由于无法高效利用秸秆,导致大量的秸秆被焚烧浪费,同时造成环境污染。纤维素是各类秸秆的主要组成成分,对秸秆浪费的同时也造成了纤维素的浪费。纤维素酶可用于降解天然纤维素。纤维素酶是一类酶,是一组可协同降解纤维素的多酶体系,由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶3种组分组成^[1]。纤维素酶来源多种多样,可由真菌、细菌、放线菌等产生^[2]。如今,世界各国均积极开展对纤维素降解菌的研究^[3]。利用微生物对纤维素进行降解,对于自然界中能源的再生利用具有重要意义

义^[4]。本试验以腐殖土壤为菌株来源,以CMC-Na为唯一碳源,筛选、分离得到产生纤维素酶的细菌。分离出产纤维素酶能力强的菌株能够加大对秸秆的利用,减少秸秆焚烧对环境的污染。

1 材料与方法

1.1 试验材料与器材

1.1.1 菌种来源

菌种采自常年堆积的腐殖土。

1.1.2 主要试剂

初筛培养基(牛肉膏蛋白胨培养基): CMC-Na 10 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.3 g, NaCl 0.1 g, FeCl₃ 0.01 g, NaNO₃ 2.5 g, CaCl₂ 0.1 g, 琼脂粉 20 g, 用蒸馏水定容至1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2;复筛培养基:

收稿日期:2020-06-08

基金项目:四川省大学生创业创新项目(S201910628019);西昌学院两高人才计划项目(LGZ201916、LGZ201926);凉山州科技局资助项目(50161006)。

作者简介:周思才(1997—),男,四川达州人,本科生,研究方向:环境微生物。*通信作者:孙劲(1975—),男,四川邛崃人,硕士,讲师,研究方向:环境微生物。

CMC-Na 15 g, K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, FeCl₃ 0.01 g, NaNO₃ 2.5 g, CaCl₂ 0.1 g, 酵母粉 5.0 g, 琼脂粉 20 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2; 产酶培养基同复筛培养基, 不加琼脂。菌体的形态特征初步鉴定培养基根据《常见细菌系统鉴定手册》^[5]配置。试剂均为分析纯。

TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)。

1.1.3 主要器材

QYC-2102C 全温培养摇床(上海新苗医疗器械制造有限公司); H/T16MM 台式高速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); LI450B 智能光照培养箱(上海皓庄仪器有限公司); DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂); 9700 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司); JS-680B 凝胶成像仪(上海培清科技有限公司); UC-7504 紫外可见分光光度计(上海精科实业有限公司); SW-CJ-2F 超净工作台(上海皓庄仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离

以常年堆积的腐殖土为菌源, 取 1 g 样品加入盛有 99 mL 无菌水的三角瓶(250 mL)中, 30 °C 条件下摇床震荡(150 r/min)45 min, 取上清液制作 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 稀释液, 并分别用移液枪取 0.1 mL 菌液, 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上, 30 °C 的条件下置于恒温培养箱中培养 24 h, 挑取单菌落接种在牛肉膏蛋白胨培养基上, 通过多次划线培养直到出现纯化菌株为止。将纯化后的单菌落点种在初筛培养基上, 30 °C 培养 48 h 后用刚果红染色法观察有透明圈的菌落, 将出现透明圈的细菌保种在斜面试管中放在 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 菌株的筛选

将纯化后的菌种点种在复筛培养基上, 30 °C 倒置培养 48 h 后, 用 0.5% 刚果红染色 30 min, 1 mol/L NaCl 脱色 30 min, 根据每株菌平板上透明圈直径 *D* 和菌落直径 *d* 比值 *D/d* 的大小, 初步判断细菌纤维素酶产量的相对高低^[4]。

1.2.3 菌株的形态初步鉴定

根据菌株的菌落和菌体的形态特征对其进行属和种的初步鉴定, 具体测定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[5]。

1.2.4 酶活力的测定

使用产酶培养基在 30 °C 以 180 r/min 震荡培养 48 h, 获得的发酵液在 25 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 用于酶活力的测定。酶活

力按照 DNS 法^[6]测定。

1.2.5 菌种分子鉴定

取 1.2.4 获得的酶活力最高的细菌培养液根据 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒中提供的方法进行细菌 DNA 的提取。将提取的 DNA 进行 PCR 体外扩增。扩增采用 25 μL 反应体系: ddH₂O 8 μL, PCR MasterMix 12 μL, 27F 1 μL, 1 492R 1 μL, 模板 DNA 3 μL; 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 终延伸 10 min, 30 个循环; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带。将获得的扩增条带切胶后送上海杰李生物技术有限公司测序, 测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 对比。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

对采取土样进行稀释涂布平板法培养, 通过纯化得到各种细菌; 再利用刚果红染色法测定其纤维素酶产量, 根据 *D/d* 的大小初步得到 4 株纤维素酶产量较高的细菌, 其中编号为 YBX-52 的细菌 *D/d* 最高, 为 4.25 (表 2), 表明其纤维素酶产量高于其他菌株。

表 2 刚果红染色法筛选结果

编号	透明圈直径 <i>D</i> /mm	菌落直径 <i>d</i> /mm	<i>D/d</i>
YBX-32	16.00	4.00	4.00
YBX-51	7.00	2.00	3.50
YBX-52	17.00	4.00	4.25
YBX-55	14.00	7.00	2.00

2.2 酶活力测定结果

利用 DNS 法对筛选的 4 株细菌进行滤纸酶活力(FPA)和羧甲基纤维素酶活力(CMC)测定, 结果表明: *D/d* 越大, 滤纸酶活力(FPA)和羧甲基纤维素酶活力(CMC)越高(表 3), 符合 *D/d* 越大纤维素酶活力越大的原理^[4]。其中, 编号为 YBX-52 的菌株酶活力最高, 故将其保留下来作为菌种资源进行后续研究。

表 3 酶活力测定结果

编号	FPA 酶活/(μmol·min ⁻¹)	CMC 酶活/(μmol·min ⁻¹)
YBX-32	220.04	231.17
YBX-51	207.48	219.45
YBX-52	221.75	274.56
YBX-55	112.45	151.48

2.3 YBX-52 菌株的鉴定分析

2.3.1 形态特征和生理生化特征

YBX-52 菌株菌落呈乳白色, 不透明; 镜检细胞

呈杆状,革兰氏阳性,有芽孢产生。生理生化指标测定结果如表4所示。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[5]将YBX-52菌株初步鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

表4 生理生化鉴定结果

测定项目	菌株 YBX-52	苏云金芽孢杆菌 (<i>B.thuringiensis</i>)
革兰氏染色	+	+
需氧性	-	-
接触酶	+	+
V-P培养物pH<6	+	+
葡萄糖产气	-	-
葡萄糖产酸	-	-
明胶水解	+	+
淀粉水解	+	+
硝酸盐还原	+	+

注:“+”为阳性反应,“-”为阴性反应。

2.3.2 分子鉴定结果

提取YBX-52菌株的DNA,然后以其为模板,用引物27F和1492R进行PCR扩增,再进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图1所示。将获得的扩增条带切胶后送上海杰李生物技术有限公司测序,测序结果与GenBank中相关数据进行相似性分析,建立生物进化树如图2所示。分析结果通过NCBI

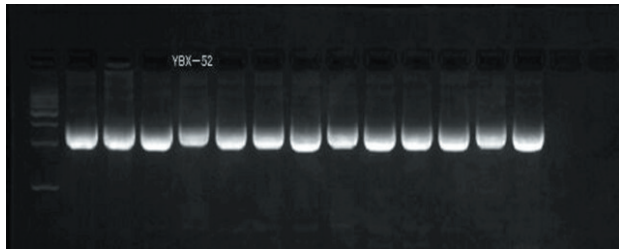


图1 凝胶电泳图



图2 进化树

的比对,发现和MN704422.1的相似度达到99%,因此将YBX-52鉴定为苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*),与生理生化鉴定结果一致。

3 结论与讨论

本试验以多年堆积的腐殖土为分离菌源,根据刚果红染色法进行分离筛选得到4株对纤维素具有降解能力的细菌。对得到的4株细菌进行进一步FPA和CMC酶活能力测定,发现一株编号为YBX-52的菌株对纤维素降解能力较强。其透明圈直径 D 和菌落直径 d 的比值 D/d 为4.25,通过DNS法测得滤纸酶活力(FPA)为(221.75 $\mu\text{mol}/\text{min}$),羧甲基纤维素酶活力(CMC)为(274.56 $\mu\text{mol}/\text{min}$)。将YBX-52进行形态、理化和分子鉴定,鉴定结果为苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*)。

自然界是一个庞大的生态系统,存在大量具有分解纤维素能力的细菌、真菌,但以往人工筛选分解纤维素能力强的大部分是真菌,包括木霉属、青霉属、曲霉属等,其中已商业化的产纤维素酶菌种有长枝木霉、黑曲霉、里氏木霉和绿色木霉^[8];产纤维素酶细菌有嗜纤维菌属、芽孢菌属^[9-10]。对细菌的研究比不上对真菌的研究。

本试验得到的菌株YBX-52的CMC酶活与王晓明等^[7]研究的绿色木霉等的酶活和何汤新等^[10]研究的里氏木霉内切葡萄糖苷酶IV在毕赤酵母中的表达中表现出的酶活相比有一定的优势;与蒋明星等^[11]从朽木周围富含腐殖质的土壤中筛选得到的细菌CMC最大酶活为218.96 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 、乐文民等^[12]在降解纤维素细菌的产酶条件的优化下得到的最大CMC酶活达到194.23 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 和黄河等^[13]分离的耐酒纤维素产生菌的最大CMC酶活可达到158.54 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 相比,本研究得到的细纤维素降解细菌CMC酶活最大可达274.56 $\mu\text{mol}/\text{min}$,效果较好。以上结果的差异可能与培养条件、培养时间和筛选的菌株有关。本试验得到的细菌为革兰氏阳性菌芽孢杆菌属,其细胞壁结构特殊,具有耐高温、耐酸、耐碱的特性^[14],有利于工业生产和实际操作。

我国每年秸秆产量9亿t,通过饲料加工生产、造纸等措施,加工副产品5.8亿t,对农作物秸秆纤维素利用率不足40%^[15]。若将YBX-52菌株对发酵秸秆和处理其他植物中的纤维素具有一定的商业化潜力,可以减轻对环境带来的负面影响和为农民带来更多的经济利益^[16]。

(下转第27页)

$$\int_0^{+\infty} \frac{rdr}{g_M(r)} = +\infty$$

使得 $|f(t, x, y, z)| \leq g_M(|z|)$, $(t, x, y, z) \in [0, 1] \times [-M, M]^2 \times \mathbb{R}$,

(H6)存在常数 $\bar{a}, \bar{b}, \bar{c} \geq 0$, 使得 $\frac{3}{2}\bar{a}^2 + 3\bar{b}^2 + 6\bar{c}^2 < 1$, 且

$$|f(t, x_2, y_2, z_2) - f(t, x_1, y_1, z_1)| \leq \bar{a}|x_2 - x_1| + \bar{b}|y_2 - y_1| + \bar{c}|z_2 - z_1|,$$

则BVP(1)有唯一解。

3 结语

本文在文献[6-7]所做工作的基础之上,在lipschitz条件成立的前提下,得到了 n 阶BVP解的唯一性结论,并给出了 $n=3$ 时解的唯一性推论,完善了文献[6-7]的研究结果。

参考文献:

- [1] CHU J F, ZHOU Z C. Positive solutions for singular non-linear third-order periodic boundary value problem[J]. Nonlinear Anal: Theory, Meth Appl, 2006,64(7):1528-1542.
- [2] FENG Y, LIU S. Solvability of a third-order two-point boundary value problem[J]. Appl Math Lett, 2005,18(9):1034-1040.
- [3] 刘爱兰.一类完全三阶两点边值问题解的存在性与唯一性[J].河南师范大学学报(自然科学版),2016,44(6):24-28.
- [4] 潘风,武晨.带有积分型边值条件的三阶边值问题两个正解的存在性[J].长春师范大学学报,2020,39(2):1-4+9.
- [5] 李嫣红,李永祥.一类完全三阶常微分方程边值问题的正解[J].吉林大学学报(理学版),2018,56(2):208-214.
- [6] 李菊鹏,李永祥.完全三阶边值问题解的存在性[J].四川大学学报(自然科学版),2018,55(4):688-692.
- [7] 李菊鹏,李永祥.一类 n 阶完全常微分方程边值问题解的存在性[J].吉林大学学报(理学版),2019,57(1):9-14.
- [8] 李朝倩.一类非线性四阶边值问题解的存在唯一性[J/OL].山东大学学报(理学版):1-8[2020-03-26].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1389.N.20200311.1645.004.html>.

(上接第7页)

参考文献:

- [1] 顾淑芳.纤维素酶产生菌的选育鉴定及产酶性能研究[D].南昌:南昌大学,2010.
- [2] 陈丽燕,张光祥,黄春萍,等.两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性[J].微生物学通报,2011,38(4):531-538.
- [3] 顿宝庆,吴薇,王旭静,等.一株高纤维素酶活力纤维素分解菌的分离与鉴定[J].中国农业科技导报,2008,10(1):113-117.
- [4] 陈敏.一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J].杭州师范学院学报(自然科学版),2001(6):11-12.
- [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,2001:349-388.
- [6] 何楠,令利军,冯蕾,等.1株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及生长特性[J].微生物学杂志,2017,37(1):43-49.
- [7] 王晓明,孙玉辉,张欢,等.绿色木霉固态发酵生产纤维素酶条件优化与酶的固定化[J].浙江农业学报,2014,26(1):186-193.
- [8] 汤新,刘刚,田生礼,等.里氏木霉内切葡萄糖苷酶IV在毕赤酵母中的表达[J].微生物学通报,2005(6):47-51.
- [9] 范晓静,杨瑞先,邱思鑫,等.内生芽孢杆菌BS2的 β -1,4-内切葡聚糖酶基因与定殖相关性[J].中国农业科学,2014,47(2):262-272.
- [10] 刘东国,吴云青,段学辉.联合生物加工产纤维素乙醇中真菌的开发与应用[J].化工进展,2018,37(9):3568-3576.
- [11] 蒋明星,丁晓帆.纤维素降解细菌的筛选及其酶活测定[J].中国农学通报,2015,31(36):161-164.
- [12] 乐文民,李江华,刘龙,等.产中性纤维素酶细菌的筛选及培养基优化[J].食品与生物技术学报,2015,34(2):183-188.
- [13] 黄河,林元山,周熠,等.一株耐酒精纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及其特性研究[J].中国酿造,2015,34(3):62-65.
- [14] 陈丽燕,张光祥,黄春萍,等.两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性[J].微生物学通报,2011,38(4):531-538.
- [15] 北京国家粮食交易中心.我国每年秸秆产量有9亿吨 利用不到四成[EB/OL].(2017-06-02)[2020-03-20]. https://www.sohu.com/a/145506749_488938.
- [16] 尚燕,颜廷武,张童朝,等.政府行为对农民秸秆资源化利用意愿的影响——基于“激励”与“约束”双重视角[J].农业现代化研究,2018,39(1):130-138.