

# 一株高效纤维素降解细菌的筛选、鉴定及酶活测定

刘露, 公春艳, 李丽, 赵宏涛\*

(青岛明月蓝海生物科技有限公司, 山东 青岛 266400)

**摘要:**以胶南玉米秸秆堆积物为菌源, 分离、筛选高效降解纤维素的菌株, 并对其进行了鉴定和酶活测定。结果表明: 采用以秸秆为唯一碳源进行富集培养及刚果红脱色圈的方法, 从胶南玉米秸秆堆积物中筛选出能降解纤维素的菌株 10 株; 通过比较透明圈大小, 筛选出一株产酶能力较高的菌株 0901; 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS)测定菌株 0901 的纤维素酶活为 1 267.43 U/mL; 根据序列比对结果, 构建关于 0901 的系统发育树, 结合其形态特征和生理生化特性将其鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 通过菌株对玉米秸秆的降解对其降解效果进行验证, 降解 30 d 后玉米秸秆失重率为 36.2%。表明, 分离筛选出的枯草芽孢杆菌菌株 0901 的纤维素降解能力较高。

**关键词:**纤维素; 降解能力; 筛选; 鉴定; 纤维素酶活

中图分类号: S216.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-4942(2015)09-0064-05

## Screening and Identification of a High - Efficient Cellulose - Degrading Bacterium and Determination of Its Enzyme Activity

Liu Lu, Gong Chunyan, Li Li, Zhao Hongtao\*

(Qingdao Bright Moon Bluesea Bio-technology Co., Ltd., Qingdao 266400, China)

**Abstract** The corn straw stack samples in Jiaonan were used as bacterium sources to isolate and screen high - efficient cellulose - degrading bacteria, and then they were identified and their enzyme activities were determined. The results showed that ten cellulose - degrading strains were isolated through enrichment culture with corn straw as the only carbon source and the method of Congo red decolorization. One strain 0901 was screened out with higher production of cellulase by comparing the size of transparent circle. The enzyme activity of 0901 was tested as 1 267.43 U/mL through the method of 3,5 - dinitrosalicylic acid colorimetry (DNS) colorimetric method. According to the results of sequence alignment, the phylogenetic tree was constructed. Combined with the analysis of morphological, physiological and biochemical characteristics, 0901 was identified as *Bacillus subtilis*. Its degradation effect on corn straw was verified. The weight loss rate of corn straw after 30 days was 36.2%. It indicated that the *Bacillus subtilis* strain 0901 had higher cellulose degradation ability.

**Key words** Cellulose; Degradation ability; Screen; Identification; Cellulase activity

纤维素是自然界中最丰富的资源之一,也是地球上数量最大的可再生资源,尤其在农业生产过程中,纤维素资源更加丰富。每年世界上产生的植物性有机物中纤维素物质约占 1 000 亿吨。

随着人类社会的不断发展进步,纤维素类废弃物日渐增多,但至今仍没有得到有效的处理和利用。

自然界中有多种微生物能分泌纤维素酶来降解纤维素,但目前生产纤维素酶的菌株普遍存在

收稿日期:2015-06-04

基金项目:国家科技部星火计划“海藻复合微生物肥料的研究与开发”(2010GA741050)

作者简介:刘露(1987-),女,山东济南人,助理工程师,硕士研究生,主要从事微生物的应用研究工作。E-mail:myhzliulu@126.com

\* 通讯作者:赵宏涛(1988-),男,山东潍坊人,助理工程师,本科,主要从事微生物肥的研发工作。E-mail:myhzfzht@126.com

酶活力较低的问题<sup>[1,2]</sup>。因此分离和筛选高效纤维素降解菌就变得至关重要,成为研究的热点和难点。

本试验以玉米秸秆堆肥为菌源,以羧甲基纤维素钠为筛选用培养基的唯一碳源,经驯化,筛选分离高效纤维素降解菌,以期对纤维素降解菌的有效利用及纤维素废弃物的进一步利用奠定基础,为解决环境问题和纤维素资源的开发利用提供重要的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

菌源:采自青岛胶南堆积1年的玉米秸秆堆积物。

主要培养基:富集培养基:玉米秸秆粉20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4$  0.3 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g,  $\text{NaNO}_3$  2.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, 酵母粉5.0 g, 蒸馏水1 000 mL;初筛培养基:CMC-Na 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4$  0.3 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g,  $\text{NaNO}_3$  2.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, 琼脂粉20 g, pH 7.0~7.2, 蒸馏水1 000 mL;复筛培养基:CMC-Na 15 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g,  $\text{NaNO}_3$  2.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, 酵母粉5.0 g, 琼脂粉20 g, pH 7.0~7.2, 蒸馏水1 000 mL;发酵培养基:同复筛培养基,不加琼脂;生理生化鉴定培养基:依据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[3]</sup>的方法配制。

主要试剂:DNA提取试剂盒、2 000 bp Ladder DNA Marker(天根生化科技有限公司),通用引物(北京六合华大基因科技股份有限公司),其余试剂均为分析纯。

主要仪器:PCR仪(TECHNE公司,TC-512)、台式高速离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司,CT14D)、凝胶成像仪(上海培清科技有限公司,JS-680B)、电泳仪(北京市六一仪器厂,DYY-8C)、超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,SW-CJ-2F)、紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司,V-1800)、摇床(江苏太仓市实验设备厂,THZ-D)、培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司,LRH-150B)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离 以胶南玉米秸秆堆积物为

菌源,采用富集培养及刚果红脱色圈的方法进行菌株分离。将10 g样品置于100 mL无菌水中,28℃振荡30 min。取原液加到以玉米秸秆为唯一碳源的富集培养基中,28℃培养3 d。取10 mL富集液转移至另一富集培养基中,连续转接3次。

将最后的富集液适当稀释,取稀释的悬液0.1 mL涂布在初筛培养基上,28℃培养。待平板长出菌落,挑取单个菌落,在另一个平板上划线纯化,多次划线并结合显微镜镜检结果检查菌落是否单一,直至获得纯培养物后斜面保存。

1.2.2 纤维素降解能力优良菌株的筛选 将筛选到的菌株接种到复筛培养基上,28℃培养7 d,0.5%刚果红染色20 min,1 mol/L NaCl脱色30 min,比较透明圈大小。

1.2.3 菌株的初步鉴定 根据菌株的菌落形态特征、菌体的形态特征及一系列生理生化鉴定试验进行属和种的鉴定,具体测定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[3]</sup>和《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[4]</sup>。

形态鉴定:将复筛得到的菌株在LB平板上划线,得到单菌落,观察并记录菌落形状、大小、颜色、边缘、透明度、表面、隆起形状及培养基的颜色变化等。挑取单个菌落,进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色等,显微镜下观察菌体形态。

生理生化鉴定:对菌株进行生理生化试验。主要进行糖类发酵试验、甲基红试验、V-P测定试验、淀粉水解试验、明胶水解试验及吲哚试验等。

1.2.4 菌株0901的16S rDNA鉴定 细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌总DNA。引物为通用引物,正向引物为27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT-3',反向引物为1492R:5'-TACGGCTACCTGTTACGACTTCACCCC-3'。

PCR反应体系:DNA(1.0 μmol/L)模板2 μL;dNTP(2.5 mmol/L)4 μL;10×Ex Taq buffer(含 $\text{Mg}^{2+}$ )5 μL;27F(10 μmol/L)1 μL;1492R(10 μmol/L)1 μL;Ex Taq DNA聚合酶0.1 μL;补足ddH<sub>2</sub>O到50 μL。

PCR条件为:95℃预变性5 min,94℃变性1 min,58℃退火30 s,72℃延伸90 s,共35个循环,最后72℃延伸10 min,4℃保温。PCR产物送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

菌株 0901 的 16S rDNA 序列分析:将所得的 16S rDNA 序列结果利用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行相似性分析。利用 Mega5.0 软件采用 Neighbor - Joining 法构建系统进化树。

1.2.5 纤维素酶活测定方法 采用 3,5 - 二硝基水杨酸比色法(DNS)测定菌株的纤维素 CMC 酶活力<sup>[5]</sup>,以 1% 的羧甲基纤维素钠为底物进行测定。每分钟产生 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6 菌株 0901 降解玉米秸秆试验 将菌株 0901 接种到 100 mL 液体培养基中,摇瓶培养 3 d,离心,弃上清,收集菌体。将玉米秸秆晒干,称取等量  $m_1$  装入 1 L 三角瓶中,121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 1.5 h,冷却后将菌种接种到三角瓶中,再加蒸馏水,使玉米秸秆含水率保持在 65% 左右。以不加菌种的三角瓶为对照。摇晃使菌液与玉米秸秆充分混匀,室温下发酵,每隔 2 d 摇动一次,30 d 后,对发酵后的底物用自来水充分冲洗,以除去可溶性物质,然后置于烘箱烘干,烘干恒重时的物质即为降解剩余物  $m_2$ 。计算玉米秸秆失重率,即失重率 (%) =  $(m_1 - m_2)/m_1 \times 100$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离筛选

本研究从玉米秸秆堆积物中分离出 20 株细菌菌株,刚果红染色能产生透明圈的有 10 株,分别为 0901、0751、16、14、1195、0781、0723、13、1193、0823。这 10 株菌不仅能在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的培养基上生长,还产生明显的透明圈,说明这 10 株菌能分解纤维素。由于菌株纤维素降解能力与透明圈直径成正比<sup>[6]</sup>,本研究以透明圈直径大小作为纤维素酶高低的标准,如表 1、图 1 所示,菌株 0901 的透明圈直径明显高于其它菌株,因此作为下一步的研究菌株。

### 2.2 菌株 0901 的鉴定分析

2.2.1 菌株的形态特征与生理生化特性 0901 菌落乳白色,圆形,不透明,表面褶皱,边缘整齐,培养基不变色。通过显微镜观察,发现 0901 菌体为杆状,有芽孢。菌株 0901 的生理生化结果如表 2 所示。

表 1 菌株平板初筛的透明圈直径

菌株编号	透明圈直径(cm)
0901	4.12
0751	1.77
16	2.64
14	3.35
1195	2.43
0781	1.17
0723	2.16
13	2.24
1193	3.16
0823	2.29

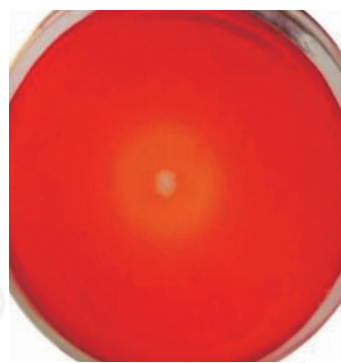


图 1 菌株 0901 的透明圈

表 2 菌株 0901 的主要生理生化特性

测定项目	菌株 0901	枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )
革兰氏染色	+	+
需氧性	+	+
葡萄糖产酸	+	+
葡萄糖产气	-	-
甘露醇发酵	+	+
淀粉水解试验	+	+
明胶液化试验	+	+
V - P 测定	+	+
吲哚试验	-	-
柠檬酸盐利用试验	+	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	-	-

注:“+”:阳性反应;“-”:阴性反应。

2.2.2 0901 菌株的 16s DNA 序列分析 测序结果显示该菌株的 16S rDNA 核酸序列全长 1 347 bp,将此序列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast 分析比对,发现与其同源性较高的菌株均属于枯草芽孢杆菌属,利用 Mega 5.0 软件采取 Neighbor - Joining 法构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统进化树(见图 2)。0901 菌株的 16S rDNA 序列同公开发表的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同

源性较高,结合其形态特征和生理生化特性,将其鉴定为枯草芽孢杆菌。

### 2.3 菌株 0901 的酶活分析

将菌株 0901 接入发酵培养基中培养,每隔 8 h 测定发酵液的纤维素酶活。如图 3 所示,接入 0901 的发酵液前期酶活迅速上升,在 80 h 时达到最高值 1 267.43 U/mL,之后酶活有所下降。菌株 0901 的酶活力曲线与祝小等<sup>[8]</sup>筛选的枯草芽孢杆菌 Pab02 类似,随着发酵时间的增长,酶活性先上升后有所下降。本试验筛选到的菌株 0901 酶活性明显高于祝小等筛选的枯草芽孢杆菌

Pab02、沈雪亮等<sup>[9]</sup>筛选的芽孢菌和李振红等<sup>[10]</sup>筛选的嗜纤维菌等。

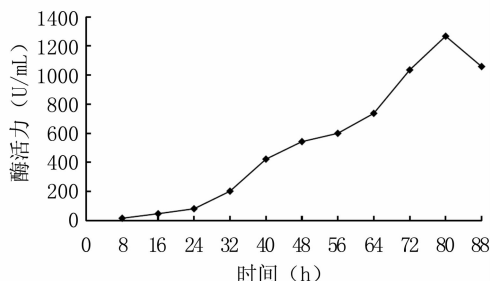


图3 菌株 0901 的产酶曲线

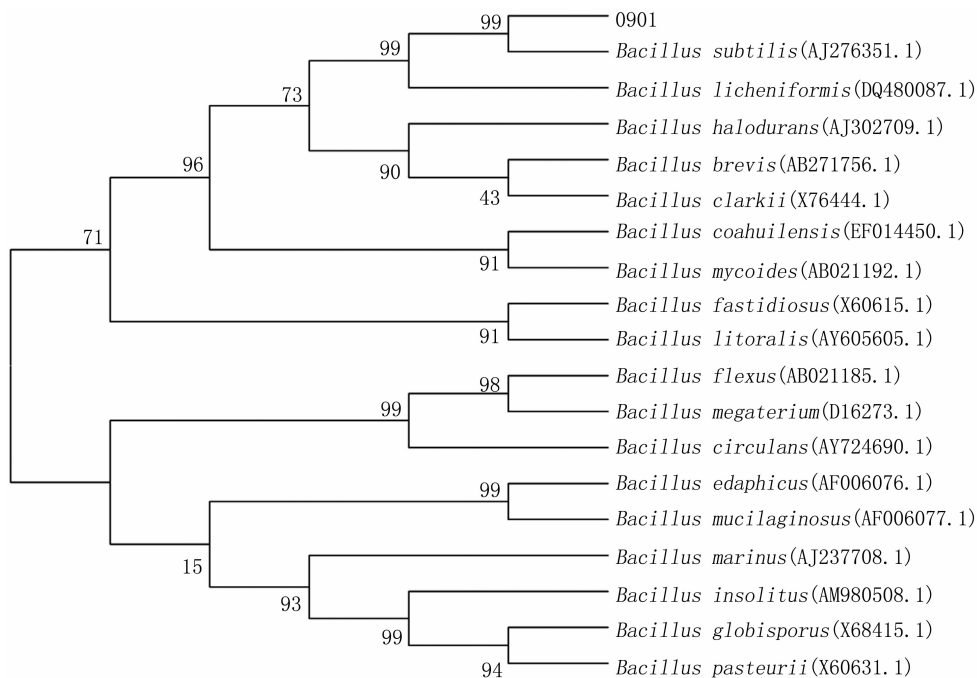


图2 菌株 0901 的系统发育树

### 2.4 菌株 0901 降解玉米秸秆试验

将菌株 0901 接种到玉米秸秆,通过 30 d 发酵,玉米秸秆与对照相比发生明显变化(见图 4),试验组比对照组秸秆颜色变黑,且表面长满菌落,测得玉米秸秆失重率为 36.2%。说明菌株具有较高的纤维素降解能力。



图4 菌株 0901 降解玉米秸秆试验

## 3 结论与讨论

本研究从玉米秸秆堆积物中分离筛选出 10 株产纤维素酶的菌株,经过复筛得到一株降解纤维素能力强的菌株 0901。结合其形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列测定,将其鉴定为枯草芽孢杆菌。采用 DNS 法测定该菌的纤维素酶活,结果表明该菌株的酶活较高。通过玉米秸秆降解试验,30 d 后玉米秸秆失重率为 36.2%,菌株纤维素降解能力较强。

以往发现的产纤维素酶的菌株多属真菌,包括木霉属、青霉属、曲霉属等,细菌中有嗜纤维菌属、芽孢菌属<sup>[12,15-17]</sup>,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

等<sup>[18]</sup>, 而未见枯草芽孢杆菌的商业化生产。菌株 0901 酶活力 1 267. 43 U/mL, 已明显高于 Geng 等<sup>[11]</sup>研究的里氏木霉和王晓明等<sup>[12]</sup>研究的绿色木霉等的酶活力, 也明显高于汤新等<sup>[13]</sup>里氏木霉内切葡萄糖苷酶 IV 在毕赤酵母中表达的酶活性。但与已报道的高产酶菌株酶活力<sup>[14]</sup>还有一定的差距, 有待通过优化培养基或诱变育种等手段进行改造, 提高其产酶能力和酶活性, 为该枯草芽孢杆菌的商品化生产奠定基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] 汪金萍, 徐尔尼, 史立康, 等. 高产纤维素酶生产方法的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(2): 73 - 76.
- [2] 迟乃玉, 张庆芳, 刘长江, 等. 纤维素酶高产菌株最适发酵条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(4): 380 - 382.
- [3] 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.
- [4] 布坎南, 吉本斯, 等. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 729 - 759.
- [5] 曾青兰. 纤维素分解菌的分离筛选[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(36): 11946 - 11947.
- [6] 杨林丽. 纤维素降解菌筛选及混合菌种纤维素降解能力测定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [7] 曾青兰. 纤维素降解细菌的分离鉴定和筛选方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10309 - 10310.
- [8] 祝小, 耿秀蓉, 潘康成, 等. 枯草芽孢杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的研究[J]. 饲料研究, 2007(1): 61 - 63.
- [9] 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.
- [10] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(3): 133 - 135.
- [11] Geng A, Zou G, Yan X, et al. Expression and characterization of a novel metagenome - derived cellulase Exo2b and its application to improve cellulase activity in *Trichoderma reesei* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 951 - 962.
- [12] 王小明, 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.
- [13] 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, 32(6): 47 - 51.
- [14] 张立静, 李术娜, 朱宝成. 高效纤维素降解菌短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) T-7 的筛选、鉴定及降解能力的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 112 - 118.
- [15] 史央, 蒋爱芹, 戴传超, 等. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 47 - 50.
- [16] Kang S W, Park Y S, Lee J S, et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology, 2004, 91(2): 153 - 156.
- [17] 范晓静, 杨瑞先, 邱思鑫, 等. 内生芽孢杆菌 BS2 的  $\beta$ -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.
- [18] Singhania R R, Sukumaran R K, Patel A K, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid - state and submerged fermentation for microbial cellulases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(7): 541 - 549.